



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TREBALL FI DE GRAU

Grau en Enginyeria Química

**INTEGRACIÓ DE PROCESSOS D'EXTRACCIÓ I TECNOLOGIES
DE MEMBRANES PER LA SEPARACIÓ I RECUPERACIÓ DE
POLIFENOLS DE RESIDUS AGRO-ALIMENTARIS**



Memòria i Annexos

Autor:	Ferran Val Tubau
Director:	José Luis Cortina
Co-Director:	Xanel Vecino Bello
Convocatòria:	Gener 2020

Resum

Els residus de la indústria agro-alimentària, si no es gestionen correctament, suposen un gran problema a nivell mundial a causa de la gran quantitat que se'n genera i la seva toxicitat. En aquest treball s'estudien dos residus, l'orujo d'oli i les lies, de les indústries de l'oli i del vi respectivament. Aquests residus són rics en components antioxidants (polifenols) i es pretén estudiar la possibilitat d'extreure'ls i separar-los. Si això és possible aquests residus es valoritzen i se'ls dona una segona vida.

En primer lloc el projecte es centra en la comparació de tècniques modernes i tradicionals d'extracció dels polifenols. En concret s'estudia la tècnica de maceració com a tècnica tradicional i es compara amb l'extracció assistida per ultrasons com a tècnica moderna. De la maceració s'estudien diferents paràmetres. S'estudia el temps d'extracció (5, 10 i 15 minuts), s'estudia la temperatura (25°C, 50°C, 70°C i 90°C), la relació sòlid-líquid (1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:200), el pH (3 i 10) i es duen a terme extraccions successives. Un cop fets aquests experiments i amb les millors condicions d'extracció es tracten els extractes amb membranes de microfiltració (MF), de nanofiltració (NF), i d'osmosi inversa (OI).

Els resultats de les extraccions mitjançant la maceració mostren que s'obtenen millors resultats que amb la l'extracció assistida per ultrasons. A més les millors condicions per a l'extracte d'orujo d'oli són 10 minuts d'extracció, 25°C, 1:30, sense alterar el pH i només una extracció; mentre que en el cas de les lies són 10 minuts d'extracció, 70°C, 1:100, sense alterar el pH i només una extracció.

Els experiments amb processos de membranes mostren que els filtres de MF deixen passar bona part dels polifenols obtenint percentatges de rebuig entre 28% i 3% per als dos extractes. Aquests filtres són capaços de separar altres components com partícules sòlides o impureses. En el cas de la nanofiltració hi ha membranes com la DURACID o la NF270 en el cas de les lies que obtenen percentatges de rebuig total entre 50% i 75%. En el cas de l'orujo d'oli les mostres són més concentrades en polifenols i els percentatges de rebuig més elevats, al voltant del 95% per a les membranes TFC-HR i NF90. Tot i així les membranes TFCs i NF270 mostren percentatges de rebuig entre 85% i 90% per a l'orujo d'oli i això suggereix que deixen passar algun dels polifenols. Finalment, les membranes d'osmosi inversa estudiades mostren percentatges de l'ordre de 86% en lies i 95% en orujo. Aquests percentatges indiquen que les membranes no deixen passar els polifenols sinó que serveixen per a concentrar la corrent de rebuig.

Resumen

Los residuos de la industria agro-alimentaria suponen un gran problema a nivel de gestión debido a la gran cantidad que se genera y su alta toxicidad, si no se tratan de forma adecuada. En este trabajo se estudian dos tipos de residuos: el orujo de aceite de oliva y las lías, de las industrias oleica i vitivinícola respectivamente. Estos residuos son ricos en polifenoles, de interés por sus propiedades antioxidantes. Se pretende estudiar la posibilidad de extraerlos, y separarlos para valorizar estos residuos y darles aplicaciones en alimentación animal y humana, y en aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

En primer lugar, el proyecto se centra en la comparación de técnicas modernas y tradicionales de extracción de los polifenoles de los residuos. En concreto se estudia la técnica de la extracción sólido/líquido utilizando agua como solvente como técnica tradicional en comparación con la extracción asistida por ultrasonidos como técnica moderna. De la maceración se estudian diferentes parámetros como el tiempo de extracción (5, 10 y 15 minutos), la temperatura (25°C, 50°C, 70°C y 90°C), la relación sólido-líquido (1:10, de 1:20, 1:30, 1:50, 1: 100, 1: 200), el pH (3 y 10) y se llevan a cabo extracciones sucesivas. Una vez hechos estos experimentos y con las mejores condiciones de extracción se tratan los extractos con membranas de microfiltración (MF), nanofiltración (NF), y ósmosis inversa (OI).

En la extracción sólido/líquido utilizando agua como solvente se obtienen mejores resultados que con la técnica de extracción con ultrasonidos con la que se compara. Además, las mejores condiciones para el extracto de orujo de aceite son 10 minutos de extracción, 25°C, 1:30, sin alterar el pH y sólo una extracción, mientras que en el caso de las lías son 10 minutos de extracción, 70°C, 1: 100, sin alterar el pH y sólo una extracción.

Una vez realizados los experimentos con procesos de filtración por membranas, los filtros de MF dejan pasar buena parte de los polifenoles obteniendo porcentajes de rechazo entre 3 y 28% para los dos extractos. Estos filtros son capaces de separar otros componentes como partículas sólidas o impurezas. En el caso de la nanofiltración hay membranas como la DURACID con sulfamida como capa activa o la NF270 con poliamida semi-aromática como capa activa, que para las lías obtienen porcentajes de rechazo totales entre 50 y 75%. En el caso del orujo de aceite las muestras son más concentradas en polifenoles y los porcentajes de rechazo más elevados, alrededor del 95% para las membranas TFC-HR y NF90, ambas con una amida aromática como capa activa. Aun así, las membranas TFCS y NF270 muestran porcentajes de rechazo entre 85 y 90% para el orujo de aceite y esto sugiere que dejan pasar alguno de los polifenoles. Por último, las membranas de ósmosis inversa muestran porcentajes del orden de 86% en lías y 95% en orujo. Estos porcentajes indican que las membranas no dejan pasar los polifenoles, sino que sirven para concentrar la corriente del rechazo.

Abstract

Food industry waste represent a big problem due to the large amount of waste generated and its high toxicity. In this project we have studied two residues, the olive pomace and the lees, in particular from the olive oil and wine industries. These residues are rich in antioxidant components (polyphenols) and it is intended to study the possibility of extracting them and separating them to revalorize this waste and use it again.

First of all, the project focuses on the comparison of modern and traditional extraction techniques of polyphenols. Specifically, the maceration of waste is studied and different parameters are studied. The extraction time (5, 10 and 15 minutes) is studied, the temperature (25°C, 50°C, 70°C and 90°C) is studied, the solid-liquid ratio (1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1: 100, 1: 200), the pH (3 and 10) and successive extractions are carried out. Once these experiments are done, the extracts are treated with microfiltration membranes (MF), nanofiltration (NF), and reverse osmosis (RO).

Once the experiments for maceration have been carried out, better results are obtained in comparison with modern techniques. In addition, the best conditions for olive oil pomace extract are 10 minutes of extraction, 25°C, 1:30, without altering the pH and only one extraction. The best conditions for lees extraction are 10 minutes of extraction, 70°C, 1: 100, without altering the pH and only one extraction.

Once the experiments with membranes have been carried out, the filters of MF let through a lot of polyphenols obtaining percentages of rejection between 28 and 3% for both extracts. These filters are capable of separating other components such as solid particles or impurities. In the case of nanofiltration there are membranes such as DURACID or NF270 that get total rejection percentages between 50 and 75%. In the case of olive oil, the samples are more concentrated in polyphenols and they have higher rejection percentages, around 95% TFC-HR and NF90 membranes. Even so, the TFCS and NF270 membranes show percentages of rejection between 85 and 90% for the olive pomace, and this suggests that some of the polyphenols pass through the membrane. Reverse osmosis membranes show percentages around of 86% in olive oil pomace and 95% in lees. These percentages indicate that membranes do not allow polyphenols to pass, but instead they can be used to concentrate the extract.



Agraïments

Aquesta investigació ha estat recolzada pels projectes Waste2Product (CTM2014-57302-R) i R2MIT (CTM2017-85346-R) i finançat pel Ministeri d'Economia i Competitivitat espanyol (MINECO) i el Govern Català (2017-SGR-312), Espanya.

M'agradaria agrair a en Jose Luis Cortina per donar-me la oportunitat de participar en aquest projecte i confiar en mi. També agrair la possibilitat que m'ha donat de realitzar el TFG al laboratori i el seguiment realitzat durant la seva realització.

En segon lloc agrair a la Xanel Vecino Bello i Mònica Reig Amat per el seguiment diari del projecte i les indicacions i supervisió de la meva feina al laboratori. Sense els seus consells i dedicació aquest treball hauria estat impossible.

També m'agradaria agrair el seguiment i supervisió de les persones que han treballat amb mi a la Universitat de Barcelona, en concret a la Dra. Mercè Granados i al Dr. Xavier Saurina que m'han donat suport i consell a l'hora d'interpretar els resultats i tirar endavant tota la part d'anàlisi i extracció. Agrair la col·laboració de la Paulina Tapia i la Maria Fernanda Montenegro que van ser qui em van guiar els primers dies de laboratori i em van facilitar molts resultats i articles per a fer el treball.

Per últim agrair el suport dels companys de laboratori José Monge, Claudia Pastor, Laura Planas i Andrea Guillaumet i a la meva família que sempre està per tot el que necessito i m'anima a tirar endavant aquest i qualsevol projecte.



Índex

RESUM	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
AGRAÏMENTS	V
1. PREFACI	1
1.1. Origen del treball	1
1.2. Motivació.....	1
2. INTRODUCCIÓ	3
2.1. Objectius del treball	3
2.2. Abast del treball	3
3. ESTAT DE L'ART	4
3.1. Economia circular	4
3.2. Residus de la producció del vi i de l'oli	5
3.3. Polifenols	8
3.3.1. Contingut de polifenols als residus de l'oli i del vi	9
3.4. Tècniques d'extracció de polifenols	11
3.4.1. UAE	13
3.4.2. Maceració.....	14
3.5. Separació de polifenols mitjançant processos de membranes	15
3.5.1. Microfiltració (MF).....	16
3.5.2. Nanofiltració i osmosi inversa (NF i OI).....	17
4. MATERIAL I METODOLOGIA EXPERIMENTAL	19
4.1. Residus de la indústria de l'oli i del vi	19
4.2. Extracció dels polifenols.....	19
4.2.1. UAE	20
4.2.2. Maceració.....	20
4.2.3. Preparació de les mostres per a l'anàlisi amb HPLC	22
4.3. Separació dels polifenols mitjançant processos de membranes	23
4.4. Anàlisi de polifenols amb HPLC.....	27
5. RESULTATS EXPERIMENTALS	29

5.1.	Extraccions de polifenols amb maceració.....	29
5.1.1.	Estudi del temps d'extracció.....	29
5.1.2.	Estudi de la temperatura.....	30
5.1.3.	Estudi de la relació sòlid-líquid.....	34
5.1.4.	Estudi del pH.....	36
5.1.5.	Extraccions successives	37
5.1.6.	Condicions òptimes per a la extracció de polifenols amb la tècnica de maceració.	38
5.2.	Tractament amb filtració per membranes.....	38
5.2.1.	Microfiltració (MF).....	38
5.2.2.	Nanofiltració (NF).....	41
5.2.3.	Osmosi Inversa (OI).....	45
6.	ANÀLISI DE L'IMPACTE AMBIENTAL	48
7.	CONCLUSIONS	49
8.	ANÀLISI ECONÒMICA	51
8.1.	Cost dels experiments	51
8.2.	Cost personal	54
8.3.	Cost total.....	54
9.	BIBLIOGRAFIA	56

1. Prefaci

1.1. Origen del treball

Aquest treball sobre la recuperació dels polifenols dels residus de la indústria del oleica i vitivinícola té com a origen les dues circumstàncies següents:

- En primer lloc, la indústria agro-alimentària és una indústria que genera milions de tones de residus a l'any arreu del món. Aquest projecte sorgeix de la necessitat d'aprofitament d'aquests residus i evitar-ne l'abocament al medi.
- En segon lloc, a l'última dècada ha augmentat l'interès per part de la comunitat científica cap a les espècies amb propietats antioxidants i en concret els polifenols que s'inclouen dins d'aquestes espècies. Les espècies antioxidants actuen inhibint i endarrerint processos d'oxidació de les molècules. Aquests processos causen malalties, envelliment i degradació de la matèria orgànica. És per això que són components de vital importància per indústries com la farmacèutica, la alimentària o la cosmètica.

1.2. Motivació

Aquest projecte experimental, està emmarcat dins del projecte "Recuperación de Recursos de Corrientes de Procesos Industriales Mediante Tecnologías Integradas de Membranas" (R2MIT), finançat pel Ministeri d'Economia y Competitivitat. En aquest treball s'ha estudiat de forma concreta la recuperació de polifenols, centrant-se en els residus de dos matrius: vi i oli. El projecte es divideix en dos parts: 1) l'estudi de l'extracció dels polifenols amb la tècnica de maceració i comparació amb la tècnica d'extracció amb ultrasons, i 2) l'estudi d'un sistema de membranes per a la separació i/o concentració dels polifenols i la purificació dels extractes.

2. Introducció

2.1. Objectius del treball

L'objectiu principal d'aquest treball és estudiar l'extracció i posterior separació de polifenols de residus de la indústria del vi i de l'oli fent servir processos de separació per membranes.

Els objectius específics del treball són:

- Optimitzar les condicions d'extracció dels polifenols utilitzant la tècnica de maceració i comparar aquesta tècnica amb altres com l'extracció assistida per ultrasons.
- Estudiar un sistema de membranes de microfiltració, nanofiltració o osmosi inversa per al tractament i concentració dels polifenols, així com les condicions del rebuig i permeat en cadascuna d'elles.

2.2. Abast del treball

En aquest treball s'ha estudiat de forma concreta la recuperació de polifenols, centrant-se en els residus de dos matrius: vi i oli. El projecte es divideix en dos parts: 1) l'estudi de l'extracció dels polifenols amb maceració i comparació amb la tècnica d'extracció amb ultrasons, i 2) l'estudi d'un sistema de membranes per a la separació dels polifenols i la purificació dels extractes.

L'extracció es duu a terme amb una dissolució de 100% aigua. S'estudien diferents paràmetres per a trobar quins donen millors resultats i preparar els extractes per a les separacions. S'estudia el temps d'extracció (5, 10 i 15 minuts), la temperatura (25°C, 50°C, 70°C i 90°C), la relació entre la quantitat de residu i la quantitat d'aigua (1g /10ml; 20ml; 30ml; 50ml; 100ml; 200ml), l'afectació del pH a la mostra (pH 3 i 10) i es fan extraccions successives. En aquestes extraccions no s'estudia l'afectació de la pressió i és per això que no s'estudien temperatures superiors a 100°C. La velocitat d'agitació es fixa a 3000 rpm i per tant tampoc s'estudia. Tampoc s'estudien líquids orgànics com a dissolvents de la matriu.

Per a la separació dels polifenols s'estudien membranes de microfiltració (0,45 µm; 0,22 µm), membranes de nanofiltració (Duracid, TFCS, TFC-HR, NF90, NF270) i membranes d'osmosi inversa (SW30HR, XLE, BW30LE). S'apliquen les membranes als extractes per a estudiar-ne el comportament. Totes les membranes anteriorment estudiades utilitzen la pressió com a força impulsora. No s'estudien altres tipus de membranes amb altres forces impulsores com la força elèctrica o la diferencia de concentració. Tampoc s'estudia el comportament de les membranes amb polifenols sintètics només s'estudien els que estan presents als extractes.

3. Estat de l'art

Durant els últims 20 anys els polifenols han captat l'atenció de la comunitat científica gràcies a les seves característiques antioxidants, entre d'altres. A més d'això la indústria alimentària, en concret la indústria del vi i de l'oli, generen molts residus, entre 30 i 40 milions de tones a l'any en diferents parts del procés de producció com la fermentació del vi o el premsat de les olives. Molts d'aquests residus com les lies i l'orujo d'oli, són rics en polifenols i es pretén utilitzar diferents tècniques d'extracció i separació amb membranes per a valoritzar aquests residus i obtenir corrents amb altes concentracions de polifenols.

3.1. Economia circular

El concepte d'economia circular fa referència a un sistema de gestió econòmic basat en la valorització dels residus. Per a fer-ho es basa en reutilitzar, compartir, reparar i reciclar creant sistemes tancats que minimitzen l'ús de recursos no reutilitzats i la creació de rebuig, pol·lució i emissions de carboni. [1]

En un sistema d'economia circular es pretén utilitzar els productes, equips i infraestructures de la forma més prolongada possible, millorant l'aprofitament dels mateixos. Tots els corrents de rebuig d'un procés es converteixen en corrents d'entrada per a altres processos. Aquesta forma d'entendre l'economia contrasta amb la forma convencional que és lineal, on la principal diferència és que el rebuig no es reaprofitat sinó que es diposita com a residu. [2]

A la Figura 1 es mostra una representació esquemàtica d'un sistema d'economia circular. Es mostra un cercle que fa referència als processos de fabricació i ús dels productes. Als dos processos es generen corrents de residu que són reaprofitades un altre cop per generar nous productes de consum i així es tanca el cercle. [2]

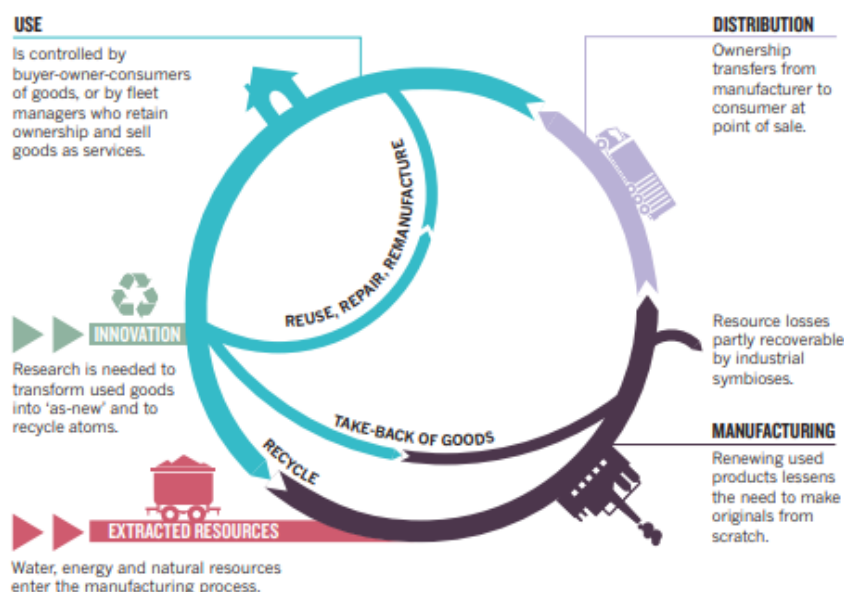


Figura 1 Esquema de un sistema de economia circular [2]

3.2. Residus de la producció del vi i de l'oli

El vi és una beguda alcohòlica provinent del raïm. Les regions vinícoles més competitives es troben a Europa (Itàlia, Alemanya, França, Portugal i Espanya) i a Amèrica (EEUU, Argentina i Xile) tot i que també se'n produeix a Sudàfrica i Austràlia. El 2017 es calcula segons la OIV (Organització Internacional del Vi) que es van produir 249.804 L/h de vi a nivell mundial.

La producció del vi comença amb la verema, és a dir la recollida del raïm de les vinyes. Tot i així el procés de producció varia en funció de les característiques del producte final (vi blanc, vi negre o vi rosat) que es desitja obtenir. [3]

Després de la recollida del raïm es premsa per a obtenir el líquid que després es convertirà en vi i s'anomena most. Un cop s'ha obtingut el most aquest es fermenta en tancs i depèn de les característiques del vi que es vol obtenir es fermenta amb les pells i llavors o no. Si aquestes no són separades amb anterioritat, hi ha un procés de decantació on es separa el residu sòlid del líquid i s'obté vi sense clarificar líquid i orujo de raïm sòlid. Un cop fet això es pot fer una segona fermentació anomenada malolàctica que proporciona al vi més suavitat en transformar l'àcid màlic que és un àcid més fort en àcid làctic que és un àcid més suau, o directament clarificar, filtrar el vi i embotellar-lo per a la seva distribució. A la Figura 2 es pot veure una representació esquemàtica d'aquest procés. [3]

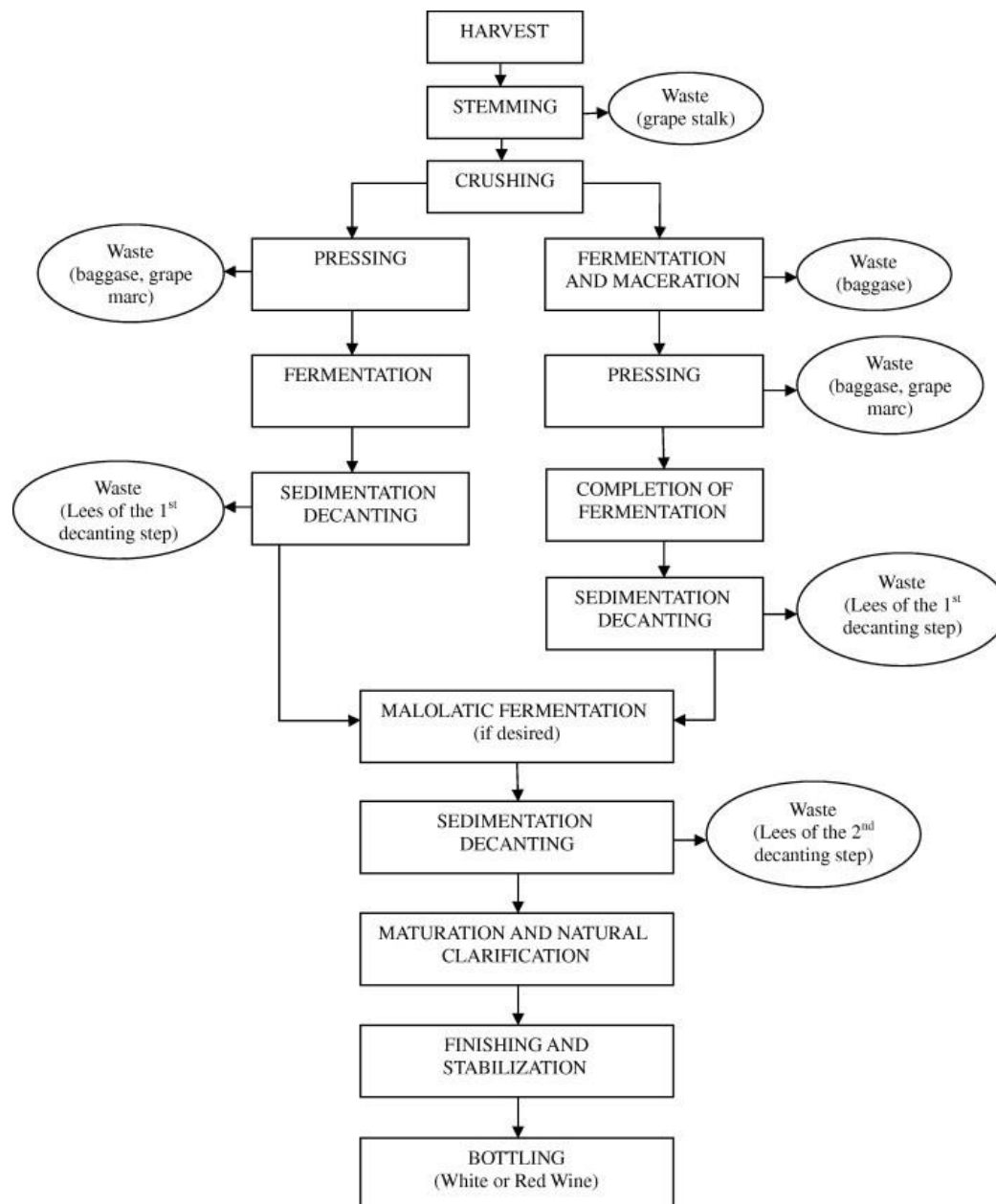


Figura 2 Esquema de producció del vi blanc i del vi negre [4]

Per tant els residus de la indústria del vi més importants són els orujos de raïm i les lies.

- Orujo de raïm: És un residu que es produeix al produir most al premsar el raïm sencer. Es compon de pells i llavors del raïm aixafades. És una font important de polifenols tot i que també s'utilitza de component principal per a la producció d'altres compostos com metanol o etanol i com a font d'energia. Se'n produeixen aproximadament 9 milions de tones/any a nivell mundial, un càlcul obtingut al 2014. [5]
- Lies de vi: Les lies són els residus generats durant processos de fermentació i maduració del vi. Està compostat per fraccions sòlides i líquides. La fracció sòlida conté tots els dipòsits de precipitats al final dels tancs de fermentació. Això és principalment biomassa microbiana,

carbohidrats insolubles, compostos fenòlics, lignina, proteïnes, metalls, sals inorgàniques, sals d'àcids orgànics i residus sòlids del raïm.

La fase líquida consisteix en el líquid de fermentació utilitzat i és rica en etanol i àcids orgànics.

També s'inclou la fracció líquida residual del procés de destil·lació del vi. [5]

D'altra banda l'oli d'oliva es defineix com l'oli obtingut de l'oliva que prové de l'arbre *Olea europaea* L. És un oli consumit arreu del món i a l'última dècada el seu consum ha augmentat en un 40%. Els principals productors arreu del món són Espanya, Portugal i Grècia. El 2018 es van produir fins a 3.100 milions de tones d'oli d'oliva a nivell mundial.[6][7]

La producció de l'oli inclou diferents etapes. L'extracció de l'oli es pot fer a través de dos processos: un procés discontinu (premsat) i un procés continu (centrifugat). [6]

El procés discontinu o premsat també s'anomena mètode tradicional, ja que és el mètode antic per a obtenir oli. En primer lloc l'oliva es renta amb aigua i passa per un procés de separació de fulles, sorra i altres impureses. Un cop separada l'oliva es mol sencera amb pinyol. Posteriorment es premsa aquesta pasta amb pressió i es separa de l'oli mitjançant un procés de decantació. [4]

El procés continu és més modern i utilitza un sistema de dues o tres fases. El procés comença igual que l'anterior amb l'oliva sent rentada, molta i la pasta obtinguda barrejada. Després es premsa aquesta pasta i s'obté l'oli líquid i el residu sòlid. A diferència del procés tradicional, aquest procés utilitza un decantador industrial per a separar les fases per centrifugació. A més el sistema de tres fases afegeix molta aigua en comparació al procés tradicional. Això és un greu problema ja que genera moltes aigües residuals i és per això que s'opta per un procés de dues fases que disminueix aquests residus. Això s'aconsegueix gràcies a l'ús de centrífugues horitzontals que no requereixen aigua calenta per a separar les fases. La Figura 3 mostra una representació esquemàtica dels tres processos de producció. [6]

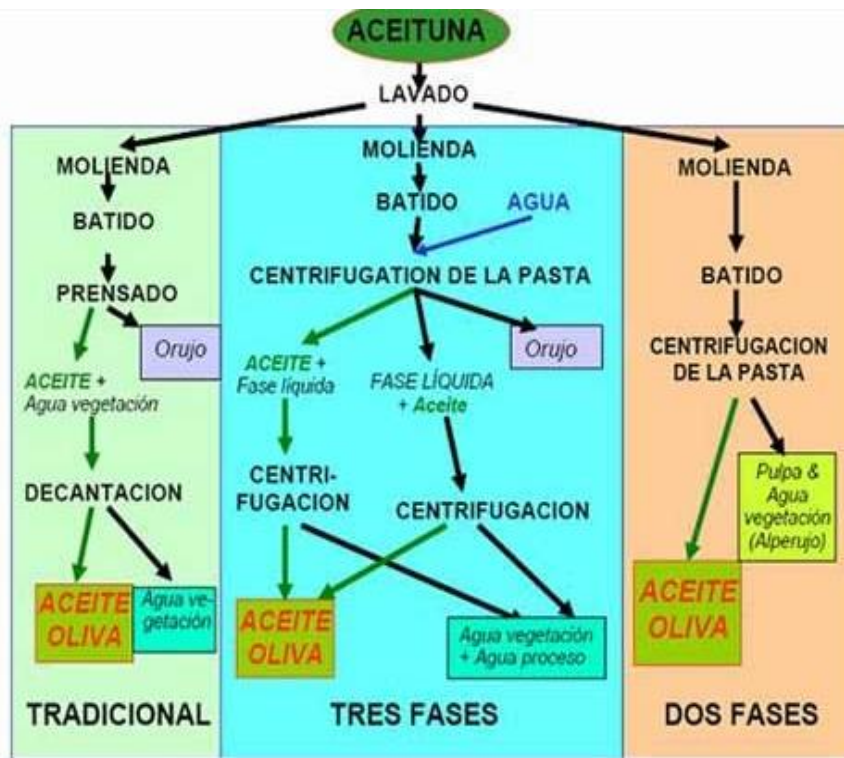


Figura 3 Esquema de producció de l'oli

Per tant els residus més importants que s'obtenen de la indústria de l'oli són l'orujo d'oli i les oliasses que engloben les aigües residuals del procés.

- Orujo d'oliva: És un residu sòlid i molt greixós que prové de la premsa de les olives per a l'elaboració de l'oli. També s'anomena alperujo a l'orujo procedent del sistema d'extracció de dues fases. Aquest residu es compon de fragments de la pell de la oliva (epicarpi), de la polpa (mesocarpi) i de l'os (endocarpi). Els components principals a nivell molecular són polisacàrids, proteïnes, àcids grassos, pigments i polifenols. La producció d'orujo a nivell mundial es va estimar al 2010 com 2.881.500 t/a. [6]
- Oliasses: És un residu que prové de l'aigua que s'utilitza per a rentar les olives, aigua de la polpa de la oliva, aigua afegida a l'orujo durant el procés de centrifugació i aigua provinent del rentat de les plantes d'extracció. Els components principals a nivell molecular són sucres, polifenols, polialcohols, lípids i pectines. La producció d'aquest residu es va estimar al 2010 entre 7 i 30 milions de m³/a nivell mundial [6]

3.3. Polifenols

Els polifenols són un grup de substàncies químiques que es troben de forma natural a les plantes i per tant a la fruita i la verdura caracteritzats per la presència de més d'un grup fenol per molècula.

Aquestes substàncies han atret molt interès des de la dècada dels 90 ja que cada cop hi ha més evidències sobre el seu impacte positiu a la salut i les seves característiques antioxidants. Hi ha diversos

estudis que demostren que el consum de polifenols a la llarga protegeix contra malalties coronaries, desenvolupament de càncer, diabetis, osteoporosis i malalties neurodegeneratives. [8]

Com a antioxidants actuen de forma que prevenen la formació de radicals lliures involucrats en processos d'oxidació. Aquests processos es donen a tot arreu com per exemple al menjar o al cos humà i en produeixen deteriorament. És per això que són molècules de gran valor per a la indústria farmacèutica, agroalimentària o cosmètica. [9]

Els polifenols es divideixen en 4 classes: àcids fenòlics, flavonoides, estilbens i lignans.

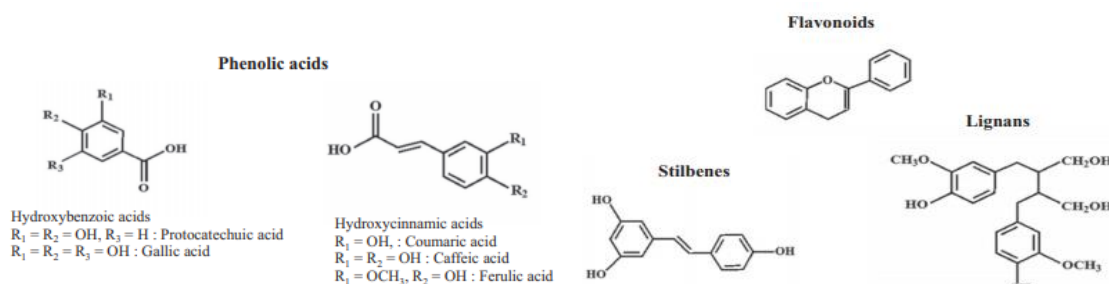


Figura 4 Famílies de polifenols [8]

Els àcids fenòlics són compostos que es distingeixen per si són derivats de l'àcid benzoic amb una estructura C1-C6 o de l'àcid cinnàmic amb una estructura C3-C6. [8]

Els flavonoides són molècules amb una estructura C6-C3-C6 i de baix pes molecular. Les unitats C6 consisteixen en dos anells aromàtics que estan units per 3 àtoms de carboni i formen un heterocicle oxigenat. Es divideixen en diferents subgrups depenent de l'heterocicle de l'estructura: flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, antocianidines i flavanols. [8]

Els estilbens són polifenols presents a la dieta humana en baixa quantitat. El component més representatiu és el resveratrol que es troba al raïm o als cacauets. [8]

Els lignans són molècules de pes molecular baix provinents del metabolisme secundari de les plantes. Són substàncies derivades de la fenil-alanina per mitjà de la dimerització de alcohols cinàmics substituïts. [8]

3.3.1. Contingut de polifenols als residus de l'oli i del vi

A les taules 1 i 2 es mostren els polifenols presents als residus de l'oli i del vi. Les taules mostren articles que han estudiat el contingut de polifenols en mostres de diferents residus de la indústria de l'oli i del vi. A més mostren quins polifenols s'han identificat a cada residu i el mètode d'anàlisi.

Taula 1 Contingut de polifenols als residus de la producció del vi

Residu	Determinació	Polifenols presents a la mostra	Ref.
Pell del raïm	HPLC-UV-VIS	t-resveratrol, àcid gàl·lic, catequina, quercetina.	[10]
Pell del raïm	HPLC- DAD	Malvidin-3-O-glucósid, quercetina, rutina, catequina, epicatequina.	[11]
Orujo de raïm	HPLC-DAD-ESI-S/MS	Malvidin-3-O-glucósido, malvidin-3-O-(6'-p-cumaroil) glucósid, quercetina, miricetina.	[12]
Orujo de raïm	HPLC-MWD	Catequina, epicatequina, malvidin-3 glucòsid, piceatannol.	[13]
Lies de vi	HPLC-DAD	Quercetina, àcid el·làgic, àcid gàl·lic, àcid cafèic, àcid p-cumàric, àcid clorogènic, kaempferol.	[14]
Lies de vi	HPLC-DAD	Àcid gàl·lic, catequina, epicatequina, procianidines B1 y B2, miricetina, quercetina, trans-caftàric, trans- coutàric, àcid cafèic, àcid p-cumàric y àcid ferúlic.	[15]
Vinassa de vi	HPLC-DAD	Àcid gàl·lic, catequina, epicatequina, quercetina.	[16]

Taula 2 Contingut de polifenols als residus de la producció de l'oli

Residu	Determinació	Polifenols presents a la mostra	Ref.
Oliasses	HPLC-DAD, LC-MS	Hidroxitirosol, tirosol, àcid cafèic, àcid cumàric, verbascòsid, isoverbascòsid, cafeoil-6 secologiosida (SEC), comselogside (COM).	[17]
Oliasses	HPLC-DAD	Hidroxitirosol.	[18]
Alperujo	HPLC-DAD	Hidroxitirosol, luteolina.	[19]

Alperujo	HPLC-UV	Àcid protocatecúic, àcid hidroxibenzoic, àcid sinàptic, àcid p-cumàric, rutina, hesperidina, àcid siríngic, àcid cafèic.	[20]
Orujo d'oliva	HPLC-UV	Hidroxitirosol, àcid protocatecúic, tirosol, àcid vanílic, àcid cafèic, àcid siríngic, vainillina, àcid p-cumàric, oleuropeïna, apigenina.	[21]
Fulles d'olivera	HPLC-DAD	Oleuropeïna.	[22]
Oliasses	HPLC-DAD	Tirosol, Hidroxitirosol.	[22]

3.4. Tècniques d'extracció de polifenols

Una extracció és el primer pas de la separació de substàncies d'interès de materials inerts o inactius utilitzant un dissolvent seleccionat i un procés d'extracció adequat. D'aquest procés s'obtenen dos components l'extracte i el rebuig. L'extracte conté els components d'interès i d'altres dissolts per el procés d'extracció. El rebuig és la part que no es dissol i que no s'extreu per el procés. [23]

Existeixen diferents tècniques d'extracció i es classifiquen principalment en tècniques convencionals i modernes. A les taules 3 i 4 es mostren les tècniques convencionals i les modernes i una breu descripció de cadascuna d'elles.

Taula 3 Tècniques convencionals d'extracció [24]

Tècniques convencionals d'extracció	Descripció
Maceració	És un mètode d'extracció molt simple amb el desavantatge de que es necessiten temps d'extracció llargs i presenta una eficiència baixa. Consisteix en submergir la matriu sòlida en un component líquid (normalment aigua, però pot ser un altre líquid) i esperar a que els components solubles es dissolguin al líquid per a que aquest quedi impregnat de les seves propietats. Pot ser en fred o en calent. [24]
Percolació	És un mètode semblant a la maceració però en aquest cas es basa en un procés continu. El percolador és un tub cilíndric que té una obertura la part superior i inferior. A la part central s'hi diposita la matriu sòlida i per la part superior es fa fluir el líquid dissolvent a través del cilindre de forma constant. A la part inferior es recull l'extracte. [24]
Extracció amb reflux (Soxhlet)	En aquest cas s'utilitza un aparell concret que s'anomena extractor Soxhlet. Aquest mètode és similar a la percolació però afegeix un sistema de reflux que permet escalfar el sistema i recuperar el dissolvent de forma contínua. L'extractor Soxhlet consisteix en un aparell similar al que s'utilitza per a fer una destil·lació amb reflux però s'afegeix un compartiment per a la matriu sòlida de la que es pretén extreure el component d'interès. [24]

Taula 4 Tècniques modernes d'extracció [24]

Tècniques modernes d'extracció	Descripció
Extracció amb fluid supercrític	L'extracció amb fluids supercrítics (SFE) utilitza fluids supercrítics (SF) com a dissolvents de l'extracció. Aquests fluids es troben per sobre del punt crític i es per això que s'anomenen supercrítics. Els SF tenen una solubilitat similar als líquids i una difusivitat similar als gasos. Les propietats com a dissolvents d'aquests fluids canvien dràsticament prop del punt crític i gràcies a això poden dissoldre gran quantitat de productes. [24]

Extracció amb líquid pressuritzat (PLE)	Aquest mètode consisteix en aplicar valors d'alta pressió a la matriu sòlida barrejada amb el dissolvent. L'alta pressió manté el dissolvent en estat líquid per sobre del punt d'ebullició i això provoca una solubilitat elevada i una gran difusió dels lípids cap al dissolvent, a més d'una gran penetració del dissolvent a la matriu sòlida. [24]
Extracció amb microones (MAE)	Aquest mètode utilitza l'energia de les microones per a l'extracció. Les ones generen calor i això afavoreix l'extracció i dissol els components de la matriu sòlida al dissolvent. [24]
Extracció amb ultrasons (UAE)	Aquest mètode utilitza l'energia de les ones dels ultrasons per a l'extracció. Els ultrasons acceleren la dissolució i difusió de la matriu sòlida a més de la transferència de calor. [24]

A continuació hi ha una explicació més detallada de les tècniques d'extracció que s'han fet servir en aquest treball: maceració i ultrasons.

3.4.1. UAE

Les sigles UAE fan referència a ultrasound assisted extraction en anglès, que es tradueix com extracció assistida per ultrasons. Aquesta tècnica consisteix en l'aplicació d'ultrasons a la matriu sòlida dissolta en un líquid que actua de dissolvent [25].

Fonamentalment l'efecte dels ultrasons té dos conseqüències a la matriu. La primera es que les cèl·lules de les plantes i fruites estan embolicades per una coberta plena de components essencials. Una característica d'aquest recobriment és que la pel·lícula que l'envolta és molt fina i es trenca fàcilment amb l'aplicació d'ultrasons facilitant l'alliberament dels components al dissolvent d'extracció. La segona és que engrandeix els porus de les parets cel·lulars. Això facilita la transferència de massa i finalment provoca en trencament de la paret que incrementa l'eficàcia de l'extracció i/o en redueix el temps. [25]

Hi ha molts estudis que utilitzen l'aplicació d'UAE per a l'extracció de polifenols i altres principis actius orgànics de fruits i plantes últims anys. Romdhane i Gourdon [26] van estudiar l'aplicació d'ultrasons a l'extracció de piretrines de flors. S'utilitza com a dissolvent hexà i els resultats mostren un increment del rendiment als 40°C utilitzant ultrasons comparat amb el rendiment a 66°C sense utilitzar ultrasons. Les gràfiques de l'article mostren el percentatge de rendiment de l'extracció i en el cas dels ultrasons mostra un rendiment de 1,5 i sense els ultrasons el rendiment és de 0,75.

Xia et al. [27] van estudiar una extracció de polifenols, aminoàcids i cafeïna a partir de te verd. Es van utilitzar ultrasons només amb aigua com a dissolvent. Els resultats mostren un augment de la concentració de polifenols obtinguda amb UAE respecte a una extracció convencional. Amb UAE es van obtenir 22,67% de polifenols extrets i amb la tècnica convencional es van obtenir 22,06%.

Rostagno et al. [28] van estudiar l'extracció amb UAE de les isoflavones que conté la soja. En aquest cas també s'utilitza aigua i etanol com a dissolvent. Els resultats obtinguts van mostrar increments d'un 10% en l'eficiència de l'extracció si s'utilitzen ultrasons respecte si no s'utilitzen a l'extracció. Les condicions òptimes per a l'extracció són 50% etanol a 60°C i 20 minuts utilitzant ultrasons.

3.4.2. Maceració

Aquest mètode d'extracció consisteix en la utilització d'un líquid per a la dissolució i extracció dels components d'interès a la mostra. Consisteix en deixar la matriu sòlida al líquid un temps determinat i els components desitjats es dissolen al líquid de forma natural. [24]

Es pot aplicar calor al sistema que provoca un augment de la temperatura i això ajuda als components sòlids de la mostra a dissoldre's en el líquid i també es pot agitar el sistema de forma mecànica. Això provoca una distribució homogènia de la calor i els components sòlids. El cost dels equips en aquest mètode és molt més baix que el cost dels equips dels mètodes moderns. Això suposa un estalvi econòmic important, tot i que cal tenir en compte el cost d'escalfar l'aigua. [24]

En diferents casos aquest mètode simple ha donat millors resultats en termes de concentració de polifenols extreta que altres mètodes més moderns i complexos. [24]

Ćujić et al. [29] van estudiar aquest mètode tradicional per a l'extracció de polifenols de fruits d'aronia assecats. S'estudien diferents dissolvents (50% EtOH/70% EtOH/90% EtOH/aigua), la mida de les fruites (6/3/2/1/0,75 mm), la quantitat de sòlid-líquid utilitzat (1:10/1:20/1:30 g:ml) i el temps d'extracció (15/30/60/90 minuts). Els resultats mostren que el temps d'extracció no és un factor important per a l'extracció. Les condicions òptimes per a l'extracció són fruits de 0,75mm amb un 50% d'etanol, la relació de sòlid-líquid és de 1:20 (g:ml). La concentració de polifenols en funció de l'àcid Gàl·lic, en aquestes condicions, és de 27,7 mg GAE/g.

Albuquerque et al. [30] comparen diferents tècniques d'extracció (maceració, MAE i UAE) per als fruits de l'arbocer. Els resultats mostren que MAE i la maceració són les millors tècniques i obtenen una concentració de 1,38 mg/g i 1,7 mg/g respectivament en funció de la catequina a les condicions d'extracció òptimes. Les condicions òptimes per a la maceració són 93,2 minuts; 79,6 °C i 23,1% d'etanol.

Jovanović et al. [31] comparen la maceració, la tècnica UAE i la maceració amb calor per a l'extracció de components de fulles de Serpoll. Les condicions òptimes per a l'extracció són partícules sòlides de 0,3 mm, 1:30 (g:ml) de relació sòlid-líquid i 50% d'etanol. Les concentracions obtingudes de àcid gàl·lic són 26,6 mg/g en la maceració; 29,8 mg/g en la maceració amb calor i 32,7 mg/g en UAE, és a dir, els resultats afavoreixen l'extracció amb UAE però els resultats són molt similars en els tres casos.

3.5. Separació de polifenols mitjançant processos de membranes

Les membranes són barreres selectives, és a dir són superfícies que deixen passar algunes substàncies i d'altres no. Poden ser membranes biològiques o sintètiques. Les membranes biològiques són les que es troben de forma natural al medi com per exemple la membrana cel·lular. Les membranes sintètiques són aquelles fabricades pels éssers humans i s'utilitzen a laboratoris i indústries. [9]

Aquest treball es centra en l'ús de membranes sintètiques. Aquestes membranes poden ser de molts materials diferents. Poden construir-se de sòlids físics (metall, ceràmica,...), pel·lícules homogènies (polímers, metalls,...), sòlids heterogenis (mesclades de polímers, barreges de vidres,...), dissolucions (normalment polímers), estructures asimètriques o líquids. A més les membranes sintètiques es classifiquen d'acord amb la seva estructura en poroses, no poroses i líquides. [9]

La Figura 5 mostra la representació esquemàtica d'una membrana i els diferents corrents que participen en un procés de tractament amb membranes. L'alimentació (A) és el corrent situat a l'esquerra de l'esquema i és l'entrada al sistema. El permeat (P) és el corrent que inclou tot allò que passa a través de la membrana. El rebuig (R) inclou tot allò que no travessa la membrana. [9]

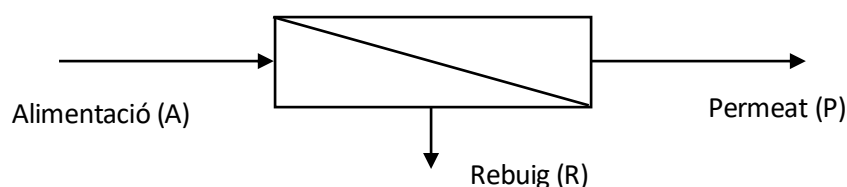


Figura 5 Esquema d'un sistema de membranes i els seus corrents

Tots els processos de membranes utilitzen una força impulsora que permet a part de l'alimentació passar a través de la membrana. La taula 5 mostra cada força impulsora i els processos que la utilitzen: [9]

Taula 5 Processos de membranes en funció de la força impulsora [9]

Força impulsora	Processos en els que participa
Pressió	Microfiltració Ultrafiltració

	Nanofiltració Osmosi inversa Piezodiàlisi
Pressió parcial	Permeat de gasos
Afinitat química	Pervaporació Diàlisi Membranes líquida
Diferència de temperatura	Destil·lació per membrana Termo-osmosi
Diferència de potencial	Electrodiàlisi Processos elèctrics de membrana

L'estudi dut a terme en aquest treball es centra en processos de membranes que tenen la pressió com a força impulsora. Les membranes de MF, UF, NF i OI són denses i es diferencien per la mida de les molècules que separen i no per la mida dels porus. A la taula 6 es mostra una llista de les membranes que utilitzen la pressió com a força impulsora i el rang de mida de molècules que separen expressat en Daltons (Da).

Taula 6 Tipus de membranes que utilitzen la pressió com a força impulsora i rangs d'aplicació en funció de la massa molecular del solut d'interès expressat en Da

Tipo membrana	Da
MF	> 100,000
UF	1,000-100,000
NF	100-1,000
OI	1-100

3.5.1. Microfiltració (MF)

El pes molecular dels polifenols oscil·la entre 100 i 4000 Da. Això vol dir que són molècules massa petites, en comparació amb la grandària de les dimensions dels porus de la membrana, com per a ser retengudes mitjançant processos de microfiltració. Tot i així existeix un factor determinant en aquests processos de membranes i és l'adsorció. L'adsorció consisteix en la interacció d'una molècula a una superfície determinada. Aquesta adhesió afecta directament al percentatge de polifenols que passa a través de la membrana i el percentatge que és retingut. [8]

Els polifenols són molècules amfipàtiques, amb anells aromàtics hidrofòbics i grups fenòlics hidrofílics amb grups hidroxils. Això provoca una relació directa entre la polaritat de les membranes de microfiltració i els polifenols que s'hi adsorbeixen. Els polifenols adsorbits augmenten al incrementar la polaritat de la membrana i l'energia lliure del component bàsic de la membrana situat a la superfície d'aquesta. [8]

Els polifenols poden interactuar entre ells i amb altres components formant partícules grans que poden tenir un impacte negatiu en el procés de filtració a través de la membrana. El flux a través de la membrana decau els primers minuts d'un procés de filtració degut a l'agregació de components fenòlics i polisacàrids als porus de la superfície de la membrana. [8]

Cartalade et al. [4] van avaluar l'adsorció de monòmers flavan-3-ol en tres membranes de microfiltració diferents. Dues membranes (M1 i M2), preparades de polivinilpirrolidona (PVP) i polisulfona (PES) són hidrofíliques per naturalesa. La tercera membrana M3 es prepara amb policlorur de vinil (PVC), un polímer bastant hidrofòbic. Els resultats de l'estudi mostren que la quantitat de flavan-3-ol adsorbit augmenta si augmenta la polaritat de la membrana. També es mostra que els polifenols i els polisacàrids són molt poc adsorbits per les membranes de povidona (PVP) i molt adsorbits per les membranes PES.

En el cas concret del tractament dels residus de la indústria del vi la presència d'etanol no afavoreix les interaccions entre soluts polars i superfícies no polars. De fet l'afinitat del polipropilè (PP) per l'àcid tànnic es va trobar molt més baixa que a les membranes de PES i no influenciada en presència de polisacàrids. La quantitat relativa de polifenols adsorbida a les membranes de PES és de 2 i 3, en canvi a la membrana de PP és de 0,5. [32]

Nawaz et al. [33] van estudiar el tractament d'extractes obtinguts a partir de llavors de raïm mitjançant membranes per a obtenir polifenols. Es comparen membranes de $0,45\mu\text{m}$ i membranes de $0,22\mu\text{m}$ amb una relació de $0,2\text{ g/ml}$ de massa de mostra i dissolvent. Els resultats mostren que les membranes amb porus més petits ($0,22\mu\text{m}$) milloren la recuperació de polifenols (l'adsorbència mostra una àrea de $0,385\text{ mAu}$) dels extractes ja que els porus més petits ajuden a separar partícules i soluts no desitjats en comparació amb $0,45\mu\text{m}$ on la recuperació de polifenols es de $0,37\text{ mAu}\cdot\text{min}$ (números). [33]

3.5.2. Nanofiltració i osmosi inversa (NF i OI)

Hi ha diferents estudis que exploren el comportament de membranes de nanofiltració i osmosi inversa per a separar polifenols. Aquests tipus de membranes no només separa pel pes molecular i la mida de les molècules sinó que són rebutjats també per forces elèctriques. [8]

Arsuaga et al. [34] van comparar el rebuig entre dues membranes una de nanofiltració (NF-90, Dow/Filmtec; TFC-HR, Koch Membrane Systems) i una d'osmosi inversa (BW-30, Dow/Filmtec). Son

membranes fines de poliamida (PA) amb una superfície de PA amb anells aromàtics. Els resultats experimentals indiquen que els fenols i polifenols són rebutjats de forma més eficient per les membranes TFC-HR i BW30 que mostren percentatges de rebuig entre 65% i 95% degut a les interaccions estèriques amb la membrana. La membrana amb resultats més elevats és la TFC-HR.

Arsuaga et al. [35] van estudiar la selectivitat dels corrents de rebuig de les membranes NF-90 i TFC-HR quan es tracten fenols i àcids dicarboxílics. Els resultats mostren que a pH natural (5,4) el rebuig de la membrana de NF-90 (30%-40%) per als fenols és menor que la mesurada amb la TFC-HR (75%-85%). Tot i que la tendència dels fenols és aquesta, la selectivitat entre fenols i àcids dicarboxílics dona millor en el cas de la primera membrana (NF-90).

Cissé et al. [36] va publicar un estudi sobre com les antocianines contingudes en un extracte de rosa de Jamaica. Els resultats mostren que la retenció d'aquest component és major per a membranes de NF (els percentatges de rebuig varien entre el 65% i gairebé el 100% a la pressió de 3 MPa) que d'UF (els percentatges varien entre 25% i 80% a la pressió de 3 MPa). En particular es seleccionen diferents membranes de NF amb diferents MWCO (des de 150 Da fins a 10000 Da) i diferents polímers (PA, PES i poliestirè). Els resultats mostren uns percentatges de rebuig d'entre 93 i 100% per a les membranes NF90, NF200, NF20 i DL. Aquest percentatge augmenta depenent de la membrana quan augmenta la pressió. Per exemple la membrana NF90 augmenta de 93% a quasi 100% entre les pressions de 0,5 MPa i 3 MPa respectivament. La membrana MPS34 augmenta entre 70% a 0,5 MPa i 80% a 3 MPa.

Cassano et al. [37] van avaluar el potencial de membranes de NF per la separació i concentració de polifenols de residus del premsat per al suc de taronja. S'utilitzen diferents membranes en espiral amb MWCO de 180, 300, 400 i 1000 Da i amb materials de PA, polipiperazina amb amines i PES. Totes les membranes estudiades mostren una mitjana elevada de percentatge de rebuig, entre un 89,2% i un 95,9%. La membrana de NF PES10 amb un MWCO de 1000 Da mostrar el percentatge més baix de rebuig de sucres, un 22,8%. Això indica que aquesta membrana és la que separa millor els sucres i els polifenols. Els resultats també mostren que al augmentar el MWCO disminueix el percentatge de rebuig.

4. Material i metodologia experimental

4.1. Residus de la indústria de l'oli i del vi

Els residus del vi són proporcionats per Bodegues Torres i són recollits durant el procés de producció de vi. En aquest treball es tracten les lles recollides entre l'Agost i l'Octubre de 2018.

Els residus de l'oli són proporcionats per l'empresa Borges i són recollits durant el Novembre i Febrer del 2017/2018. En aquest treball es tracta l'orujo d'oliva com a mostra per als experiments. A la Figura 6 es mostra l'aspecte dels dos residus, a l'esquerra l'orujo d'oliva y a la dreta les lles. Aquestes s'emmagatzemen en un congelador en tubs Falcon a -20°C.



Figura 6 Mostres d'oli Borges (esquerra) i de vi de Torres (dreta)

4.2. Extracció dels polifenols

Per a obtenir els polifenols continguts als residus anteriorment mencionats el primer pas és processar-los mitjançant un mètode d'extracció. En aquest treball s'estudia la maceració (una tècnica convencional) i es compara amb la tècnica UAE (una tècnica moderna) per comparar resultats. A més, s'estudien diferents paràmetres en el procés de extracció mitjançant la maceració per a obtenir les millors condicions d'extracció.

4.2.1. UAE

L'extracció de polifenols assistida per ultrasons es duu a terme amb l'equip de bany d'ultrasons Branson 5510, tal i com es mostra a la Figura 7. El procediment per a l'extracció és el següent:

- Les mostres de lies i orujo d'oli es descongelen fins a estar a temperatura ambient (25°C).
- Es pesa 1 g de mostra amb una balança analítica en un tub Falcon de 50 mL.
- S'afegeixen 20 mL d'una mescla de 50:49,9:0,1 d'etanol (EtOH):H₂O:HCl (v/v/v) (Aquestes condicions s'han estudiat en projectes anteriors i es consideren les millors en quant a eficiència entre quantitat de polifenols extreta i quantitat de dissolvent orgànic emprat).
- Les mostres es mesclen en un agitador vòrtex durant 30 segons.
- S'introdueixen els tubs Falcon a l'equip d'ultrasons durant 30 minuts i a temperatura ambient (25°C).
- Un cop finalitzada l'extracció la solució es transfereix a vials de 10 mL i es preparen per a l'anàlisi mitjançant l'aparell de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC).

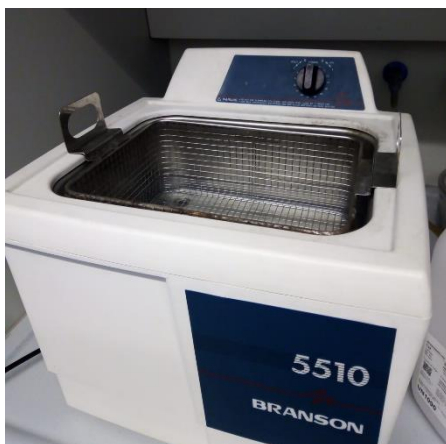


Figura 7 Equip d'extracció amb ultrasons

4.2.2. Maceració

A la taula 7 es mostren els paràmetres que s'estudien i quins valors s'han estudiat en el procés de extracció mitjançant la maceració.

Taula 7 Paràmetres i valors estudiats durant l'experiment

Paràmetre	Valors estudiats
Temps d'extracció (min)	5/10/15
Temperatura (°C)	25/50/70/90

Relació sòlid líquid (g:ml)	1:10/1:20/1:30/1:50/1:100/1:200
pH	S'estudien valors de pH 3 i 10 i el pH sense alterar de les mostres
Extraccions successives	Es fan 4 extraccions successives amb el sòlid de l'extracció anterior. L'aigua MilliQ es renova per cada extracció.

El dissolvent utilitzat en tots els experiments és 100% d'aigua MilliQ. A cada estudi es fixen totes les variables i es varia una d'elles per a veure l'impacte en l'extracció de polifenols. Conforme es van estudiant es fixen les condicions que donen millors resultats, en l'ordre de la taula. El procediment per a l'extracció és el següent:

- Les mostres de lies i orujo d'oli es descongelen fins a estar a temperatura ambient (25°C).
- Es pesa 1 g de mostra amb una balança analítica en un recipient adient per a l'extracció.
- S'afegeix el volum d'aigua (ml) adient:
 - Si s'estudia la relació aquest volum varia. Als primers experiments el volum es fixa a 20 ml. Als darrers experiments on s'ha estudiat la relació el volum d'aigua és el que dona millors resultats.
 - L'aigua afegida als experiments on s'estudia el pH es tracta prèviament i se li ajusta el pH. Es preparen de forma prèvia una dissolució d'aigua amb àcid clorhídric de pH 3 i una de hidròxid de sodi de pH 10. El volum d'aigua afegit és d'aquestes solucions.
- S'afegeix un imant als recipients i quan s'escalfa la mostra per sobre de 25°C es tapen per evitar pèrdues per evaporació. Les mostres que són a temperatura ambient no es tapen. Aquests es dipositen a una placa agitadora i calefactora. L'agitació es fixa a 3000 rpm i la temperatura de la placa es varia en funció de l'experiment. Als primers es fixa a 90°C i als darrers un cop estudiada, es fixa a la temperatura amb els resultats més eficients.
- Un cop agitat i escalfat el temps adient es treuen de la placa calefactora i es preparen per a l'anàlisi mitjançant l'aparell de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC).
- A l'experiment on s'estudien les extraccions successives el sòlid recuperat després de centrifugar es reaprofitja i amb aquest sòlid es fa una nova extracció seguint tots els passos anteriors.

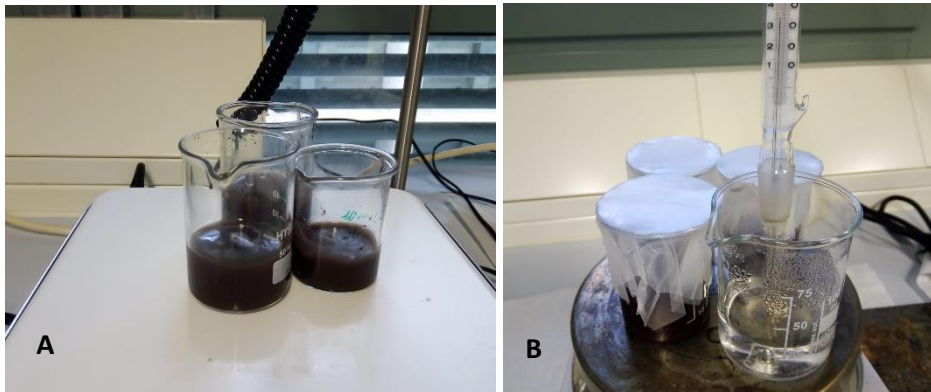


Figura 8 Extracció dels extractes macerant: A mostra d'orujo d'oli; B mostra de lles

4.2.3. Preparació de les mostres per a l'anàlisi amb HPLC

Un cop finalitzades les extraccions amb les diferents tècniques es condicionen els extractes per al seu posterior anàlisi amb un aparell HPLC. El procediment per a la preparació és el següent:

- Es centrifuguen les mostres durant 15 minuts a 3500 rpm i s'elimina el sòlid sobrant (excepte a les extraccions successives).
- A continuació els extractes es filtren amb filtres de 0,45 μm i es disposen en vials de 1,5 mL degudament etiquetats.

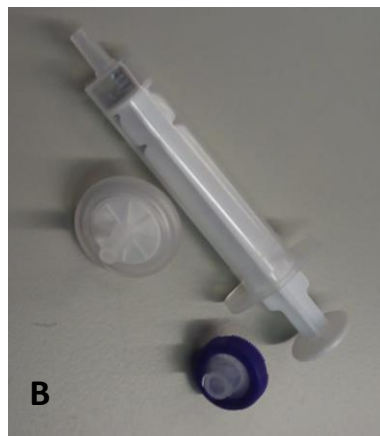
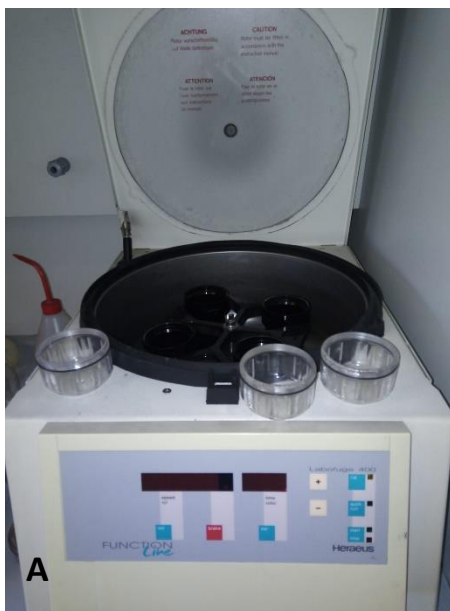


Figura 9 A: Centrifuga B: Filtres i xeringa

4.3. Separació dels polifenols mitjançant processos de membranes

Es produeix un litre d'extracte amb les millors condicions de la tècnica de maceració per les lies i l'orujo d'oli. Aquests extractes s'empren per a realitzar assajos de separació amb tecnologia de membranes. Les membranes utilitzades són de microfiltració (0,45 μm ; 0,22 μm), de nanofiltració (Duracid, TFCS, TFC-HR, NF90, NF270) i d'osmosi inversa (SW30HR, XLE, BW30LE). A la taula 8 es mostra una llista de les membranes estudiades en aquest treball i la seva composició:

Taula 8 Membranes utilitzades als experiments i les seves característiques

Membrana	Fabricant	Composició de la membrana
MF		
Filtres en format disc 0,45 μm	Filtros Anoia	Es compon de una barreja d'èsters de cel·lulosa, concret acetat de cel·lulosa i nitrat de cel·lulosa (MCE)
Filtres en format disc 0,22 μm	Filtros Anoia	Es compon de una barreja d'èsters de cel·lulosa, concret acetat de cel·lulosa i nitrat de cel·lulosa (MCE)
NF		
DURACID	GE	Sulfamida de capa activa i polisulfona de suport
TFCS	KMS-Fluid Systems	Poliamida aromàtica de capa activa
TFC-HR	KMS-Fluid Systems	Amida aromàtica de capa activa
NF270	Dow-Filmtec	Poliamida semi-aromàtica de capa activa
NF90	Dow-Filmtec	Amida aromàtica de capa activa
OI		
BW30LE	Dow-Filmtec	Poliamida aromàtica de capa activa amb la superfície coberta d'un alcohol polivinil
SW30HR	Dow-Filmtec	Poliamida aromàtica de capa activa amb la superfície coberta d'un alcohol polivinil
XLE	Dow-Filmtec	Poliamida aromàtica de capa activa

Per realitzar els experiments amb les membranes es requereix de diferents equips. En primer lloc s'utilitza una bomba d'alta pressió "Waters 515 HPLC Pump" per a bombejar l'extracte a través del sistema de membranes. En segon lloc s'utilitza una cel·la de membranes "MemHPLC", que té una àrea activa de 113 cm^2 . En aquest aparell s'instal·la la membrana i surt el permeat i el rebuig. Aquests dos corrents tornen al tanc de l'alimentació creant així un sistema tancat. També s'utilitzen tubs per a connectar tot el sistema i una balança gravimètrica per a mesurar el pes de permeat i posteriorment calcular diferents paràmetres (per exemple cabal). El tanc de l'alimentació es situa sobre una placa agitadora que manté l'extracte en agitació. Per últim s'empra un cronòmetre per a calcular el temps que es necessita per a recollir el pes de permeat. A la Figura 10 es pot veure el muntatge del sistema tancat de membranes i a la Figura 11 una imatge de l'interior de l'equip de membranes:

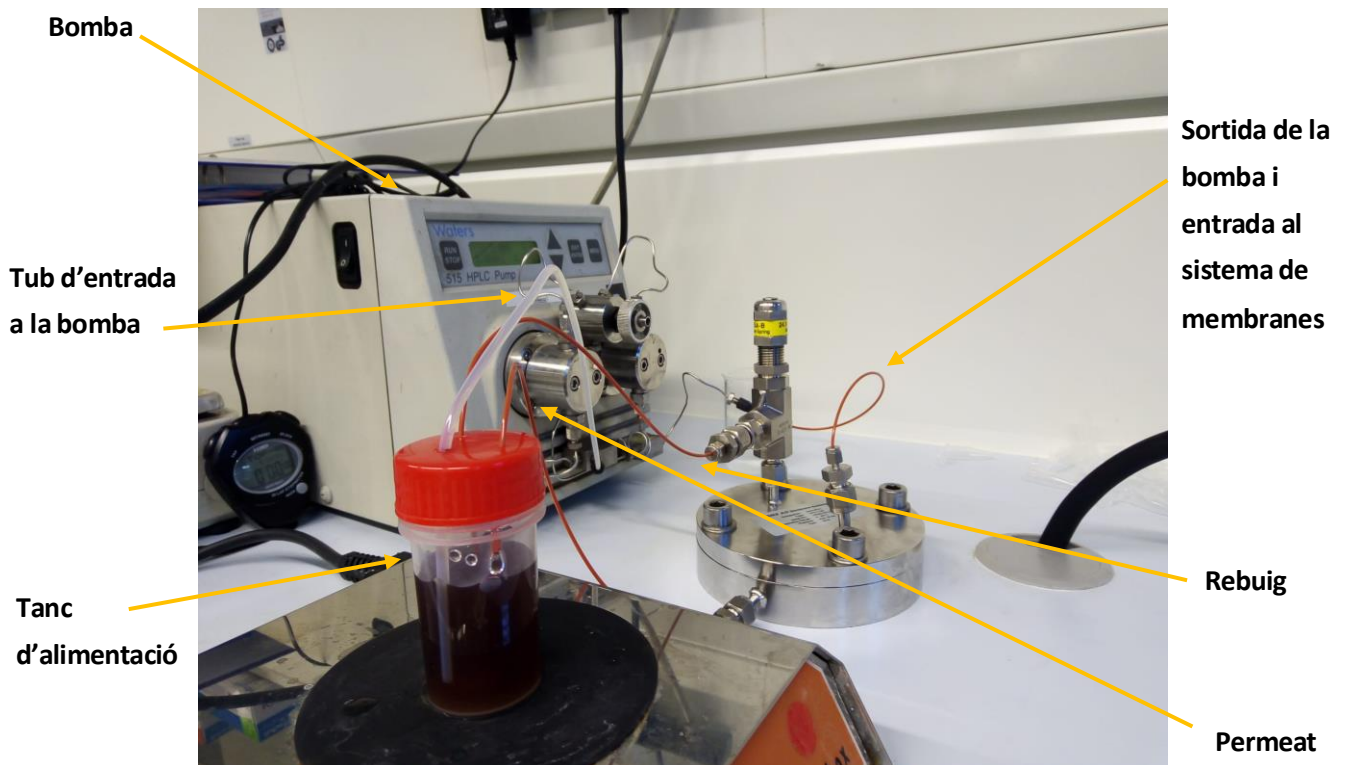


Figura 10 Muntatge del sistema tancat de membranes



Figura 11 Part interna del dispositiu de membranes MemHPLC

El procediment per a la separació amb membranes és el següent:

- Totes les membranes de NF i OI emprades es deixen en aigua Mil·liQ 24 hores abans de començar l'experiment per a eliminar els productes de conservació de les membranes i a més aquest procés densifica el suport de les membranes.
- Un cop les membranes de NF i OI han estat amb aigua 24 hores, es purga la bomba amb aigua Mil·liQ durant 5 minuts a 5 ml/min per a eliminar impureses i netejar-la.
- A continuació es mesuren 30 ml d'extracte i es dispositen a un recipient de 50 ml que fa de tanc d'alimentació.
- Es munta el sistema tancat descrit anteriorment amb la membrana i l'extracte connectats de forma que el permeat i el rebuig tornen al tanc d'alimentació (sistema tancat). La membranes de NF i OI tenen dues cares una activa (cara brillant) i una no activa (cara no brillant). A l'hora de muntar la membrana es col·loca amb la cara activa amunt ja que és el costat per on entra l'alimentació. A més sota la membrana es col·loca un spacer per evitar-ne el contacte directe amb la part inferior i el possible trencament. Aquest spacer és una fina capa en forma de reixa d'un material inert i no afecta a l'experiment.
- En el cas de la NF es comença la pressurització de la membrana. Es bombeja extracte pel sistema al màxim cabal al que es realitzarà l'experiment (10 ml/min). El rang de cabal d'entrada al que es realitzen els experiments és entre 1 i 10 ml/min augmentant 1 ml/min a cada prova.

- Es prenen mesures cada 10 minuts de conductivitat amb un conductímetre fins a que dues mesures donen iguals i es considera que la membrana ha estat pressuritzada i la capa activa de la membrana densificada.
- A continuació comença l'experiment. S'imposa un cabal d'1 ml/min a la bomba i s'esperen 5 minuts a que el sistema s'estabilitzi. Un cop estabilitzat el flux, s'extreu 1 ml de mostra del permeat.
- Es puja el cabal 1 ml/min i es repeteix el procés d'estabilització i presa de la mostra. Això es repeteix fins a 10 ml/min.
- Es pesa el volum de permeat obtingut cada vegada i es calcula el temps que es triga en obtenir-lo.
- Un cop acabat l'experiment s'extreu la membrana mentre es purga la bomba, es renta el dispositiu de membranes i es canvia la membrana per a començar un nou experiment.
- Tots els experiments realitzats amb totes les membranes es realitzen per duplicat.

Per a determinar l'eficàcia de les membranes en la separació i concentració dels polifenols s'empren diferents paràmetres amb diferents fórmules. El primer que es calcula és el cabal de permeat (Q_{Permeat}) mitjançant les mesures de temps i massa preses al laboratori de la mostra. La fórmula és la següent:

$$Q_{\text{Permeat}} \text{ (ml/s)} = \frac{M_{\text{Permeat}} \text{ (g)}}{\rho_{\text{extracte}} \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) \cdot t \text{ (s)}}$$

La Q_{Permeat} fa referència al cabal de permeat que passa a través de la membrana. La M_{Permeat} fa referència a la massa de permeat obtinguda al pesar la mostra. La t fa referència al temps que es mesura amb el cronòmetre i és el temps que es triga en obtenir la mostra. La ρ_{extracte} fa referència a la densitat de l'extracte i tenen valors diferents. La densitat de l'orujo d'oli és 0,983 g/ml i la de les lies és 0,976 g/ml.

En segon lloc es calcula el flux de permeat (J_v) que es defineix com a cabal de permeat entre l'àrea activa de la membrana. La fórmula és la següent:

$$J_v \left(\frac{\text{l}}{\text{h} \cdot \text{m}^2} \right) = \frac{Q_{\text{Permeat}} \left(\frac{\text{l}}{\text{h}} \right)}{\text{Àrea activa} \text{ (m}^2\text{)}}$$

La J_v fa referència a flux de permeat que passa a través de la membrana. La Q_{Permeat} fa referència al cabal de permeat que passa a través de la membrana. La Àrea activa és la àrea de contacte entre la membrana i l'extracte. En aquest aparell té un valor de 113 cm².

En segon lloc, es calcula el percentatge de rebuig (R), que és una representació de quina quantitat de polifenols rebutja la membrana. La fórmula emprada és la següent:

$$R (\%) = 1 - \frac{C_{\text{Permeat}}}{C_{\text{Alimentació}}} \cdot 100$$

La R és el rebuig i fa referència a la quantitat de polifenols que es rebutgen per la membrana respecte als que hi havia a l'alimentació en forma de percentatge. La C_{Permeat} fa referència a la concentració de polifenols al permeat i la $C_{\text{Alimentació}}$ fa referència a la concentració de polifenols a l'alimentació.

4.4. Anàlisi de polifenols amb HPLC

Per a l'anàlisi de les mostres tant de les extraccions com dels processos amb membranes s'utilitza un equip de cromatografia líquida d'alta eficàcia o HPLC (High performance liquid chromatography, per les seves sigles en anglès). L'equip en concret és un Agilent Series 1100 amb una bomba quaternària, sistema d'injecció i una matriu de díodes detectors. La columna que s'ha utilitzat és una Kinetex C18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm), on els components polars elueixen i es distribueixen més ràpid per la columna que els no polars que es retenen més temps. A la Figura 12 es mostra l'equip al laboratori.



Figura 12 Equip HPLC

La fase mòbil de la cromatografia consisteix en dues fases: una fase aquosa amb un 0,1% d'àcid fòrmic (EMSURE, 98%-100% dissolvent A) i una fase orgànica d'acetonitril (Fisher Chemical, dissolvent B). El

mètode d'injecció i de control es duu a terme amb el software AgilentChemStation i és des d'on es programa l'equip i es consulten els resultats. L'equip funciona amb un cabal de fase mòbil de 0,4 mL/min, la pressió de la bomba es limita fins a 400 bars. Per a cada anàlisi cal esperar un temps de condicionament de l'equip i estabilització de la pressió (normalment al voltant dels 80 bars). Es registren 3 cromatogrames diferents a 280, 310 i 370 nm en l'espectre l'UV. L'equip injecta 5 µl de la mostra. No necessita temperatura.

Cada injecció triga 50 minuts en realitzar l'anàlisi i la bomba injecta un gradient que varia durant el temps els percentatges de fase orgànica i fase aquosa. Per a l'orujó d'oli i les lles s'utilitzen dos gradients diferents, compresos en els mètodes MET12 i MET10 respectivament. Aquests gradients es poden observar a les taules 9 i 10:

Taula 9 Gradient per a l'anàlisi de mostres d'orujó d'oli (MET12)

Temps (min)	0	38	40	42	42,2	50
Percentatge de fase orgànica B (%)	5	35	90	90	5	5

Taula 10 Gradient per a l'anàlisi de mostres de lles (MET10)

Temps (min)	0	38	40	42	42,2	50
Percentatge de fase orgànica B (%)	5	45	90	90	5	5

Cada cop que s'injecten les mostres obtingudes a les extraccions i als processos de membranes s'injecten quatre patrons de polifenols sintètics a l'equip. Aquests patrons contenen els polifenols que s'espera trobar a l'extracte de lles i a l'extracte d'orujó d'oli. Els patrons tenen una concentració coneguda de cada polifenol de 10 mg/L i es comptabilitza l'àrea a sota de cada pic del cromatograma.

Per a l'anàlisi dels extractes els cromatogrames són complexos i amb els pics molt junts. Es per això que no s'estudia l'àrea de cada pic sinó que es calcula l'àrea total a sota de tots els pics. Un dels polifenols injectats és àcid gàl·lic i es coneix la relació entre la concentració de 10 mg/L de àcid gàl·lic i l'àrea obtinguda a sota el pic. Aquesta relació s'aplica a l'àrea total obtinguda als cromatogrames dels extractes i s'obté una dada de concentració en base a àcid gàl·lic. Tots els resultats de concentració estan referits a aquesta relació d'àrea i concentració. La relació diu que amb 10 mg/L d'àcid gàl·lic s'obtenen 353,3 mAu·min.

5. Resultats experimentals

5.1. Extraccions de polifenols amb maceració

5.1.1. Estudi del temps d'extracció

En primer lloc s'estudia la viabilitat de la tècnica de maceració per a l'extracció de polifenols de l'orujo d'oli i de lies de vi. En aquest primer estudi es fixen totes les variables i s'estudia l'efecte del temps a l'extracció (5, 10 i 15 min). Es fixa la temperatura a 90°C i la relació sòlid:líquid a 1:20 (g/ml).

En paral·lel també es duu a terme una extracció amb ultrasons per a comparar la quantitat de polifenols extreta amb un mètode tradicional i un modern. Les condicions per a l'extracció són les mencionades punt 4.2.1 (50:49,9:0,1 (EtOH):H₂O:HCl (v/v/v), 30 min, 25°C, 1:20). A continuació la Figura 13 mostra els resultats de concentració total de polifenols obtinguda a les mostres extretes amb maceració i diferents temps i amb ultrasons.

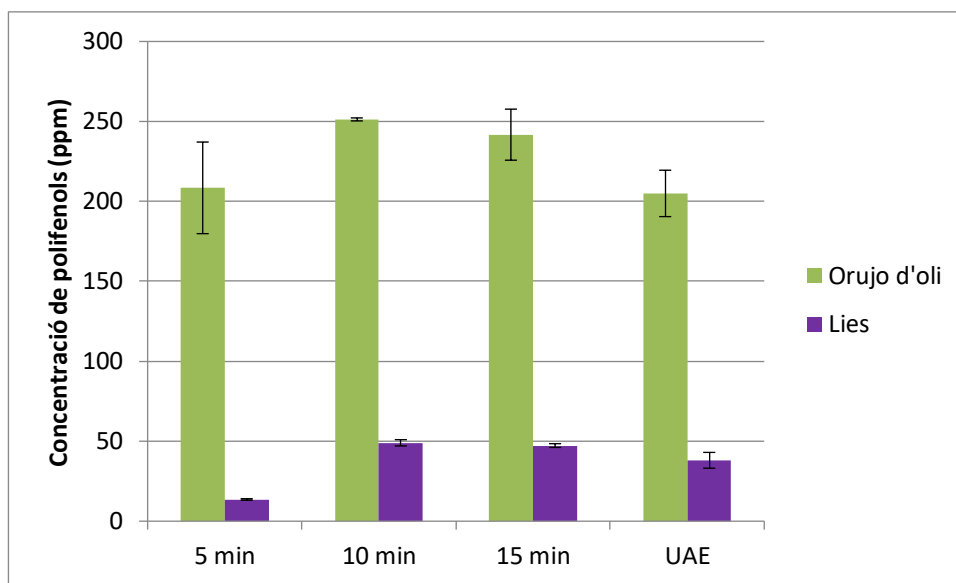


Figura 13 Concentració de polifenols en funció del temps d'extracció i comparació amb UAE

Als resultats s'observa que la diferència de concentració entre extreure 10 minuts i 15 minuts és d'un 3,79% en el cas de lies i de 3,52% en el cas de l'orujo d'oli. Entre 5 minuts i 10 minuts d'extracció hi ha una diferència més gran, sobretot a l'extracte de lies que és d'un 72,27%. En el cas de l'orujo d'oli la diferència és de 17,02%. En conclusió no és necessari que el temps d'extracció sigui 15 minuts ja que no augmenta la quantitat de polifenols extreta i inclús pot generar degradació a la mostra, degut a l'efecte de la calor. Per tant, es selecciona el temps d'extracció òptim de 10 minuts per als dos extractes.

A més la Figura 13 mostra que els ultrasons extreuen $205 \pm 14,5$ mg/L de polifenols en el cas de l'orujo d'oli i $38 \pm 4,9$ mg/L en el cas de les lies. Aquest valors de concentració de polifenols són més baixos que l'obtingut amb la maceració utilitzant un temps d'extracció de 10 minuts en els dos extractes (250 ± 16 mg/L per a l'orujo i 50 ± 2 mg/L per a les lies). Això demostra que aquesta tècnica més simple i amb certs avantatges econòmics dona millors resultats d'extracció que la tècnica moderna UAE.

Hi ha estudis que mostren que en intervals més llargs de temps la tendència és a augmentar la concentració de polifenols extreta amb aquesta tècnica però que arriba un moment que s'estabilitza. Cujic et al. [29] també van estudiar el temps d'extracció amb la tècnica de maceració i aquest va mostrar una tendència similar a augmentar la quantitat de polifenols extreta quan augmenta el temps d'extracció. Els intervals de temps que es va utilitzar en aquest estudi són entre 15 i 90 minuts. Els valors òptims d'extracció es van obtenir als 90 minuts i es va obtenir una concentració de 13,5 mg GAE/g DW que fa referència a mil·ligrams d'àcid gàl·lic per gram de mostra inicial seca.

Albuquerque et al. [30] també es va estudiar l'impacte del temps d'extracció en la tècnica de maceració. En aquest cas es va estudiar l'extracció en el fruit de l'arboç. També es van estudiar intervals de temps més prolongats entre 15 i 150 minuts i als 95 minuts es va observar un pic de concentració que va ser de 1.4 mg GAE/ g DW. Les concentracions en funció del temps oscil·len entre 0,75 i 1,4 mg GAE/ g DW

5.1.2. Estudi de la temperatura

Un cop estudiat el temps d'extracció, aquest es fixa en 10 minuts per a totes dues mostres i s'estudia la temperatura, ja que és un factor important a nivell econòmic i d'eficiència de la tècnica. Les altres variables segueixen fixes tal i com ho estaven a l'experiment anterior (relació sòlid:líquid a 1:20 (g/ml)). També es repeteix l'experiment amb ultrasons per a comparar els resultats de la tècnica tradicional amb la tècnica moderna. Es fa un primer experiment els resultats del qual es mostren a la Figura 14.

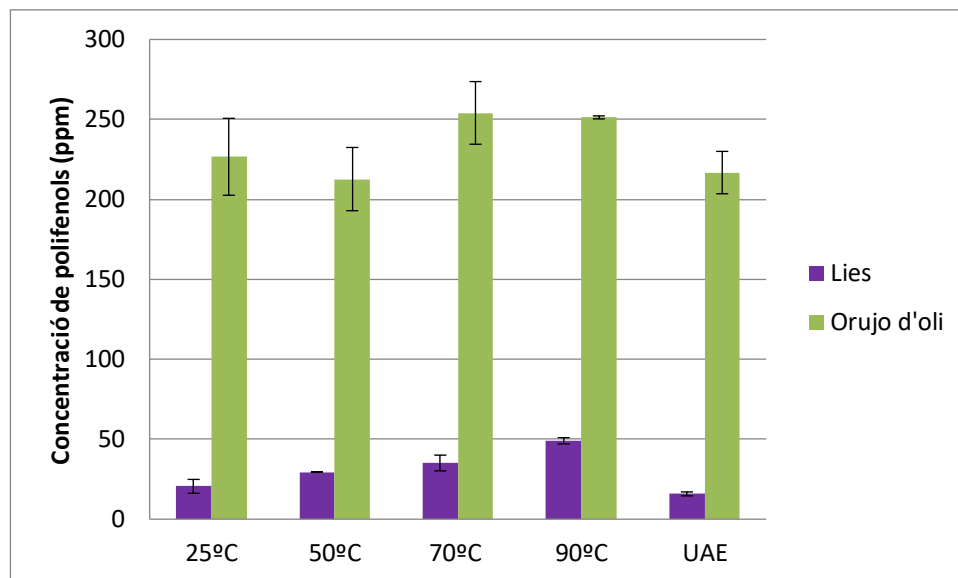


Figura 14 Concentració de polifenols extrets en funció de la temperatura i comparació amb UAE

Els resultats mostren que en el cas de les lies hi ha una clara tendència a augmentar la quantitat de polifenols extreta quan augmenta la temperatura. En el cas de l'orujo d'oli aquesta tendència no existeix. De fet tenint en compte les barres d'error a 25°C i 50°C no sembla que s'extreguin diferents concentracions de polifenols i a 70°C i 90°C aquesta concentració és major que a les altres temperatures. Tot i així comparant aquestes dues últimes concentracions no s'observa cap increment dels polifenols extrets. Pel que fa a la comparació amb UAE el gràfic corresponent a l'orujo d'oli mostra la mateixa tendència que a l'experiment anterior, és a dir, dona un valor una mica més petit que les extraccions amb maceració. En canvi en el cas de les lies la concentració de polifenols és de $15,8 \pm 1,2$ mg/L que contrasta amb la obtinguda a l'experiment on s'estudia el temps d'extracció que era de $38,8 \pm 4,9$ mg/L.

Degut a la heterogeneïtat de les mostres, els resultats obtinguts no són suficients per a extreure conclusions i es repeteix l'experiment. En aquest segon cas les dades es mostren seguint el mateix tipus de gràfic com el de la figura 14, és a dir, concentració total en funció de la temperatura. A més s'afegeix un nou tractament a les dades i s'estudia el comportament de les diferents famílies de polifenols amb la temperatura. Les famílies de polifenols són retingudes per la cromatografia a diferents temps de retenció. Això vol dir que al principi del cromatograma s'observen els hidroxibenzoics, a continuació els hidroxicinàmics i al final els flavonoides. A continuació es mostren dos gràfics per a cada extracte, el primer on es mostra la variació de la concentració de polifenols (mAU.min) total en funció de la temperatura i el segon on es mostra l'efecte de la temperatura per famílies.

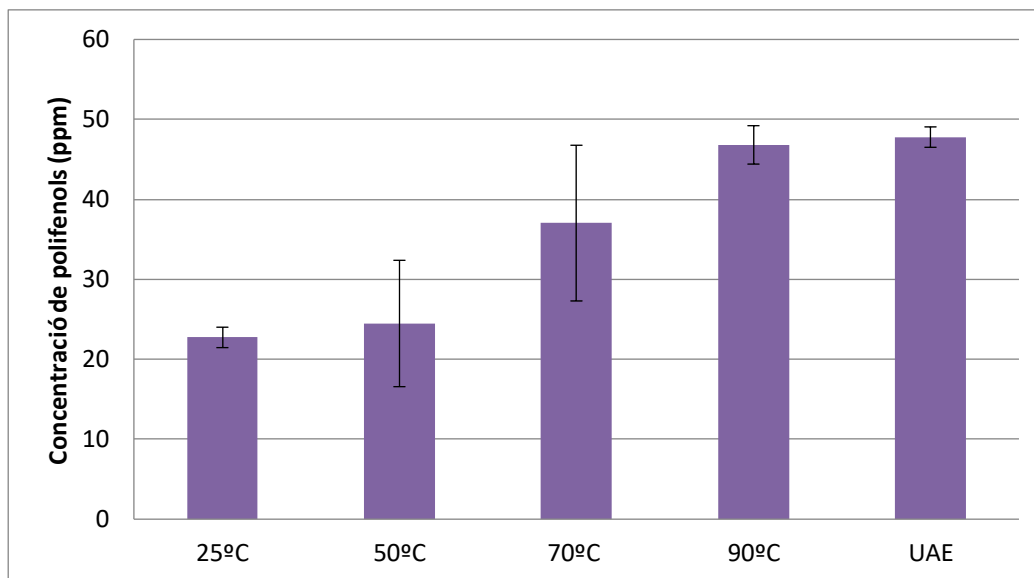


Figura 15 Concentració de polifenols total en funció de la temperatura i comparació amb UAE de lles

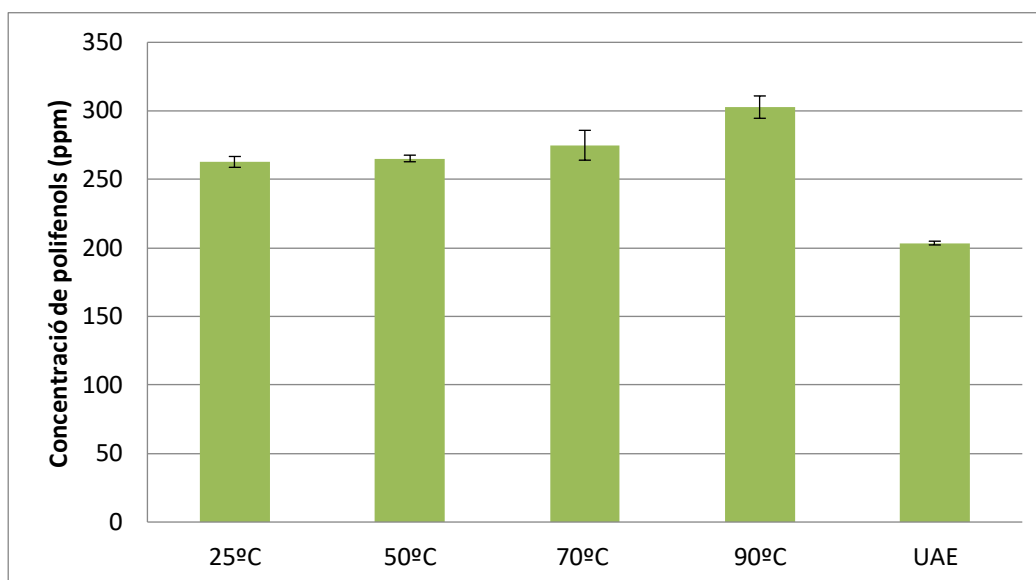


Figura 16 Concentració de polifenols total en funció de la temperatura i comparació amb UAE de l'orujo d'oli

Tal i com mostren les figures 15 i 16 la tendència de l'orujo d'oli i la de les lles de l'anterior experiment es confirmen. A l'orujo no li afecta la temperatura a l'extracció ja que el gràfic mostra un valor d'extracció igual en tots els casos. La diferència més gran és d'un 9,2% i la concentració de polifenols obtinguda és entre 265 ± 4 mg/L i 300 ± 8 mg/L. En el cas de les lles hi ha una tendència clara a augmentar la concentració de polifenols a l'extracte amb l'augment de la temperatura. La concentració de polifenols als 70°C és de $35,8 \pm 1$ mg/L i als 90°C és de $46,8 \pm 2$ mg/L. En el cas de la comparació

amb ultrasons l'orujo d'oli mostra la mateixa tendència que a l'experiment de l'estudi del temps (5.1.1), l'extracció amb ultrasons per al les lies en aquest cas dona més alta, un valor de $47,8 \pm 1$ mg/L.

Com es pot observar a la Figura 17 la tendència per famílies mostra que en el cas de les lies els més afectats per la temperatura són els hidroxibenzoics i els hidroxicinàmics ja que mostren pendents positius pronunciats. Els flavonoides, que són els menys abundants a la mostra, són els menys afectats ja que mostren una línia horitzontal al gràfic. En el cas de l'orujo, com es pot observar a la Figura 18, la temperatura afecta als flavonoides i la tendència és a augmentar la quantitat de flavonoides extreta si augmenta la temperatura.. Les dues altres famílies, que són els hidroxibenzoics i els hidroxicinàmics, mostren tendències horitzontals que expliquen la poca afectació de la temperatura a la quantitat de polifenols extreta en aquest cas.

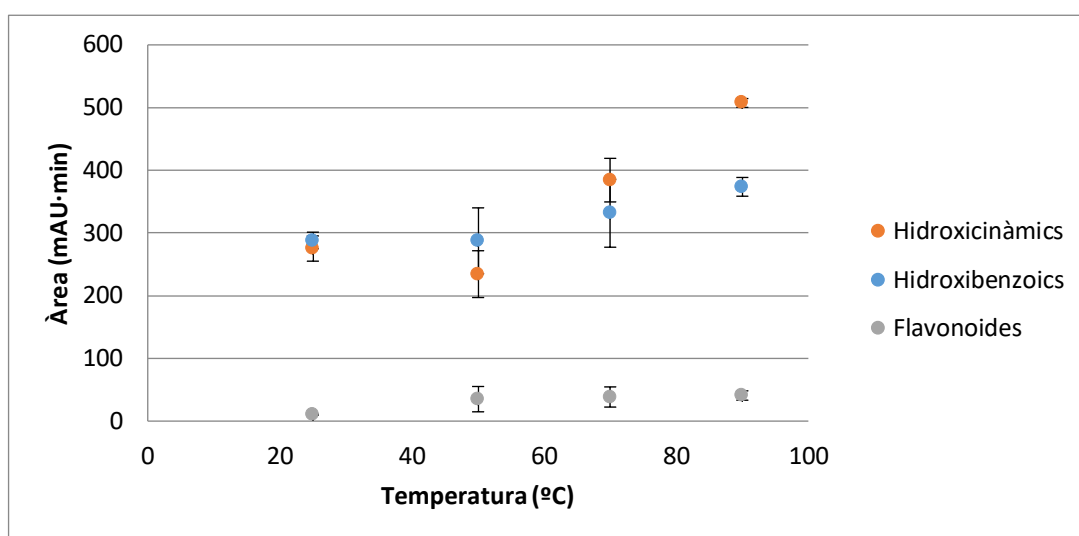


Figura 17 Variació de la concentració de polifenols (mAU.min)) en funció de la temperatura separada per famílies de lies

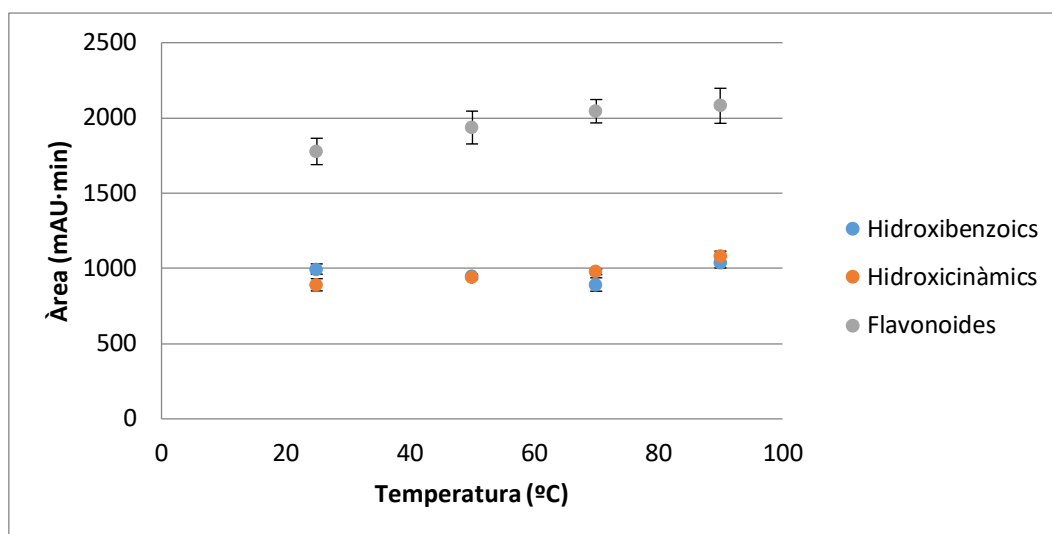


Figura18 Variació de la concentració de polifenols (mAU.min)) en funció de la temperatura separada per famílies de l'orujo d'oli

En conclusió per a l'orujo d'oli no es necessari escalfar la mostra ja que la quantitat de polifenols obtinguda és pràcticament la mateixa independentment de la temperatura, la diferència entre valors de concentració de polifenols més gran és de 9,2%. Per tant la temperatura escollida és temperatura ambient (25°C). En el cas de les lles es calcula quan costa energèticament escalfar fins a 50°C, 70°C i 90°C un cert volum d'aigua. La diferència entre escalfar l'aigua fins a 70°C i fins a 90°C augmenta el cost energètic en un 30,77%. En canvi la diferència de polifenols extrets a 70°C i 90°C suposa un increment d'un 23,6%. És per això que no és necessari escalfar fins a 90°C i el valor de temperatura escollit per a les lles és de 70°C.

Albuquerque et al. [30] van estudiar l'impacte de la temperatura en la maceració i van obtenir que la tendència és a augmentar la quantitat extreta si augmenta la temperatura. En el seu cas als 70°C es va obtenir un pic de concentració. Aquesta tendència coincideix amb els resultats obtinguts en aquest experiment. La concentració que es va obtenir en aquest article a les condicions de temperatura òptimes és de 1,4 mg GAE/g DW.

5.1.3. Estudi de la relació sòlid-líquid

A tots els experiments anteriors la relació entre el sòlid de la mostra i el líquid es fixa en 1:20 (g:ml). Després d'estudiar la temperatura s'estudia com afecta aquesta relació a cadascuna de les mostres. En aquests experiments es fixa la massa de mostra a 1 g i es varia el volum d'aigua. A continuació a la Figura 19 es mostra un gràfic resum de diferents experiments amb diferents relacions sòlid:líquid.

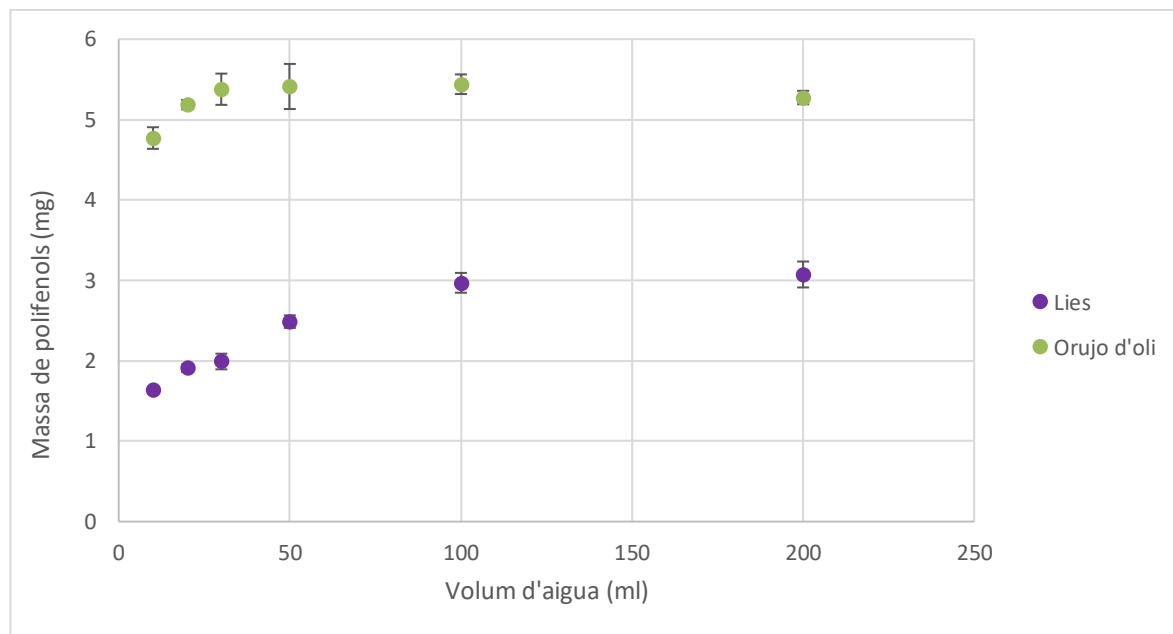


Figura 19 Massa de polifenols(mg) extreta en funció del volum d'aigua afegit (ml)

En aquest cas les dades per als dos extractes mostren una tendència a augmentar la quantitat de polifenols extreta quan augmenta la quantitat de volum d'aigua utilitzat per a l'extracció. En ambdós casos s'arriba a un valor estable on més volum d'aigua no es tradueix a més polifenols extrets. En el cas de l'orujo d'oli el primer punt on s'observa això és a la relació 1:30 (g:ml) on l'augment respecte al següent punt és d'un 3,5%. És per això que aquesta és la relació que s'escull per als següents experiments.

En el cas de les lies la quantitat de polifenols augmenta fins a la relació de 1:100 (g:ml) on l'augment respecte al següent punt és només d'un 3%. És per això que aquesta és la relació escollida per als següents experiments.

Cujic et al. [29] també van estudiar la relació sòlid-líquid amb la tècnica de maceració. Els volums que van ser utilitzats en el seu cas coincideixen amb els primers d'aquest experiment i són 1:10, 1:20 i 1:30 (g/ml). Els resultats mostren que la tendència és a mateixa que la dels resultats obtinguts, més volum de dissolvent millora l'extracció de polifenols. El valor òptim de concentració és de 13,5 mg GAE/g DW a 1:30. Això indica que la relació entre el volum de líquid afegit i el sòlid extret tendeix a estabilitzar-se tal i com mostren els resultats del treball.

Jovanovic et al. [31] també van estudiar la diferents relacions sòlid-líquid 1:10, 1:20 i 1:30 (g/ml) i van obtenir que més dissolvent es tradueix en més quantitat de polifenols extrets amb maceració, maceració amb calor i UAE. En concret a la maceració, per a la millor relació amb dissolvent, s'obtenen

resultats de TFC (contingut total de flavonoides) al voltant de 9 mg/L a 1:10 (g:ml) i 11 mg/L a 1:20 (g:ml) i 14 mg/L a 1:30 (g:ml).

5.1.4. Estudi del pH

En aquest cas s'estudia l'efecte del pH de l'aigua que s'empra per a l'extracció dels polifenols en els extractes de lies i orujo d'oli. El pH natural sense alterar de les mostres és 5 i s'acidifica la mostra i es basifica per a observar si això millora l'extracció. Per a aquest experiment es mantenen fixes els paràmetres ja estudiats, és a dir, el temps d'extracció, la temperatura i la relació sòlid-líquid. Els valors triats són els que han donat millors resultats. La Figura 20 mostra els resultats de les extraccions:

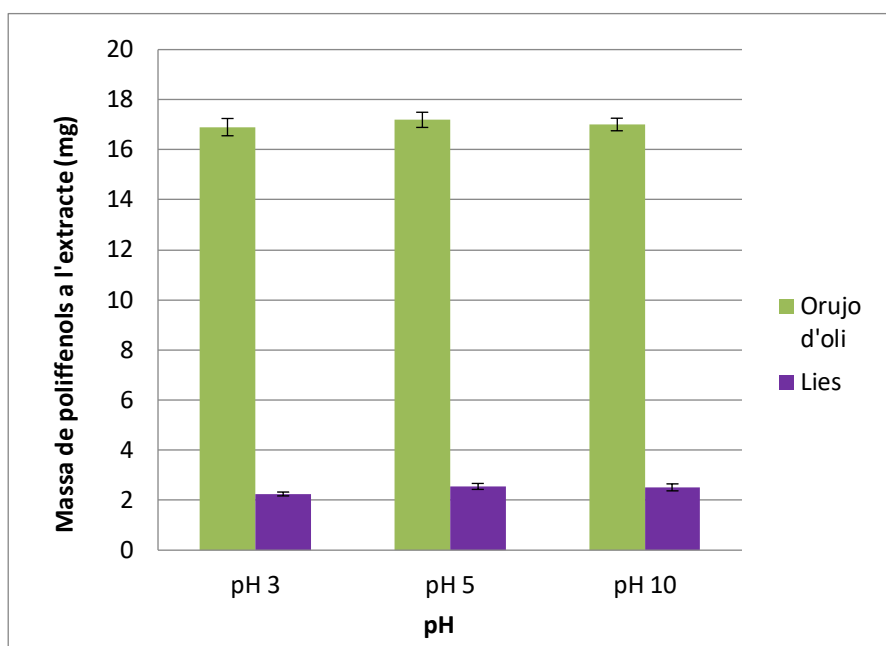


Figura 20 Massa extreta (mg) de polifenols en funció del pH

En el cas de les lies, tal i com mostra la Figura 20 l'extracció amb pH 3 dona resultats de massa de polifenols extreta un 11,8% més baix que els altres pH. Les extraccions amb pH 5 (sense alterar el pH) i pH 10 són un 1,5% diferents i donen un valor de massa extreta de polifenols de $2,5 \pm 0,1$ mg. En el cas de l'orujo d'oli les extraccions amb pH 5 (sense alterar el pH), pH 10 i pH 3 donen molt similar, al voltant de $17 \pm 0,3$ mg de massa extreta de polifenols. Les diferències entre els valors de massa estudiats per als tres valors de pH són iguals o inferiors a un 1,7%

En conclusió la variació del pH no afecta a l'extracció dels polifenols, de fet un pH àcid empitjora l'extracció respecte a no alterar el pH. Per tant les extraccions es fan sense alterar el pH.

L'efecte del pH a l'extracció de polifenols i altres factors ha estat estudiat per Cruz et. al. [39]. En aquest article es mostra una taula on compara el valor del coeficient d'activitat antioxidant (AAC) dels polifenols extrets de fusta d'eucaliptus hidrolitzada per a diferents valors de pH (3/6,5/10) i diferents

relacions sòlid-líquid (1:1/1:3). Els resultats que es van obtenir són de 588 AAC a un pH de 3, 272 AAC a un pH de 6,5 i 397 a un pH de 10. És per això que els millors resultats s'obtenen amb pH àcid. Això representa una millora del 53% respecte a un pH de 6,5. Aquestes conclusions contrasten amb els resultats obtinguts en aquest treball.

5.1.5. Extraccions successives

En aquest cas es fa una primera extracció amb les millors condicions obtingudes a tots els experiments anteriors. Per a les lles les condicions són 10 minuts, 70°C, 1:100 (g/ml) i pH sense alterar i per a l'orujo d'oli les condicions són 10 minuts, 25°C, 1:30 (g/ml) i pH sense alterar. Després del procés de centrífuga es recull el sòlid i es fa un nou procés d'extracció per maceració amb les mateixes condicions. Això es repeteix fins a quatre cops per als dos extractes. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 21.

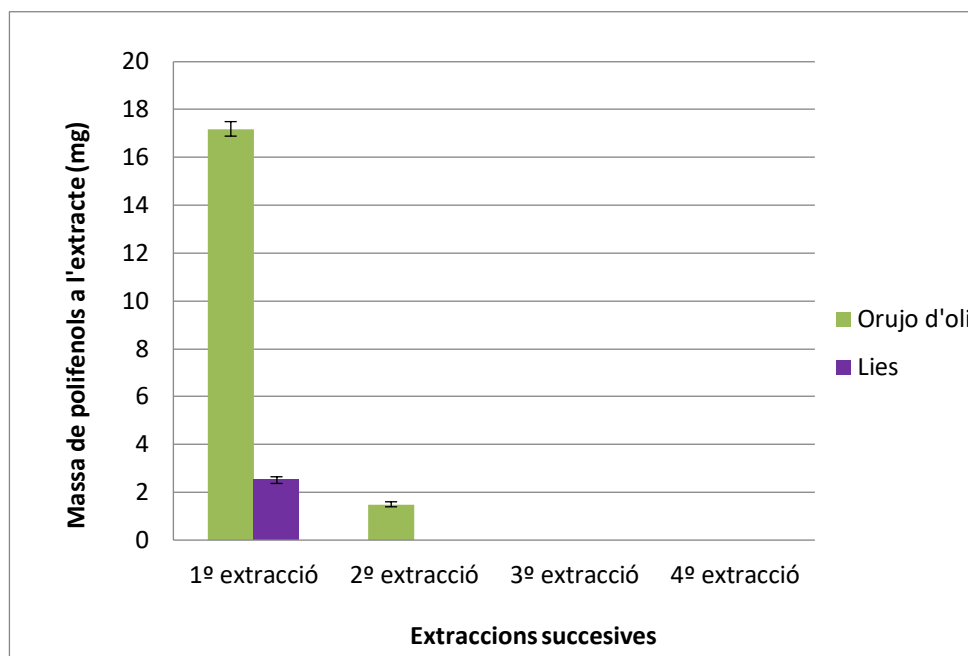


Figura 21 Massa extreta en funció de l'extracció successiva corresponent

La tendència és la mateixa en el cas dels dos extractes. Tal i com mostra la Figura 21 a la primera extracció s'extreu una quantitat mesurable de polifenols per als dos extractes. Al segon procés d'extracció, s'extreu una quantitat un 91,3% més baixa a l'orujo d'oli i per a les lles està per sota del límit de detecció de l'equip d' HPLC (és per això que no apareix la barra amb el valor). A la tercera i la quarta la concentració de polifenols està per sota del límit de detecció de l'HPLC (per a les lles és 4,5 mg/L i per a l'orujo d'oli és 8 mg/L). La conclusió és que es fa una primera extracció i el sòlid separat es descarta ja que la concentració de polifenols a les següents extraccions és molt baixa.

5.1.6. Condicions òptimes per a la extracció de polifenols amb la tècnica de maceració.

A la taula 11 es mostra un resum de les condicions òptimes per a l'extracció de polifenols amb la tècnica de maceració. Els extractes utilitzats al tractament de membranes s'extreuen amb aquestes condicions òptimes.

Taula 11 Resum de les condicions òptimes de la maceració

	Relació sòlid :líquid (g/ml)	Temps (min)	Temperatura (°C)	pH	Extraccions successives	Densitat (g/ml)
Lies	1:100	10	70	5 (sense ajust)	Primera extracció	0.976
Orujo d'oli	1:30	10	25	5 (sense ajust)	Primera extracció	0,983

En el cas de les lies la concentració de polifenols total sota aquestes condicions és de 33 mg/L i en el cas de l'orujo d'oli és de 172,8 mg/L. Aquests valors de concentració s'utilitzen de referència per a calcular els valors de rebuig dels resultats obtinguts amb els processos de membranes. A més aquests són els valors de concentració de polifenols obtinguts a l'alimentació dels processos de membranes que estan fets amb les condicions òptimes de la taula 10.

En un estudi previ s'han fet rectes de regressió amb concentracions conegudes de polifenols sintètics. Per a cada polifenol aquest valor és diferent però per a la majoria dels polifenols no es detectava cap pic a les concentracions més petites, en el seu cas de 0,5 mg/L. Les gràfiques anteriors mostren concentració total i no de polifenols individuals. A les mostres de lies s'observen 9 pics que són diferents polifenols. Assumint de forma general una concentració de 0,5 mg/L com a límit de detecció, la concentració total més baixa observable és de 4,5 mg/L.

A les mostres d'orujo d'oli s'observen 16 pics que són diferents polifenols. Tot i així en aquest cas els pics estan molt propers i és més complicat de diferenciar-los. Assumint de forma general una concentració de 0,5 mg/L com a límit de detecció, la concentració total més baixa observable és de 8 mg/L.

5.2. Tractament amb filtració per membranes

5.2.1. Microfiltració (MF)

A les figures 22 a) i b) es mostra l'evolució del flux de permeat en funció del cabal d'entrada. A la Figura 22 a), per a l'extracte de lies es mostra una tendència a augmentar el flux de permeat quan augmenta el cabal d'entrada per a les dues membranes (0.45 µm y 0.22 µm). El valor de flux de permeat augmenta

des de $3 \pm 0,05 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ fins a $28,5 \pm 1,2 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ i a cada mesura augmenta de mitjana $2,6 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ de forma constant per a les dues membranes ($0,45 \mu\text{m}$ y $0,22 \mu\text{m}$).

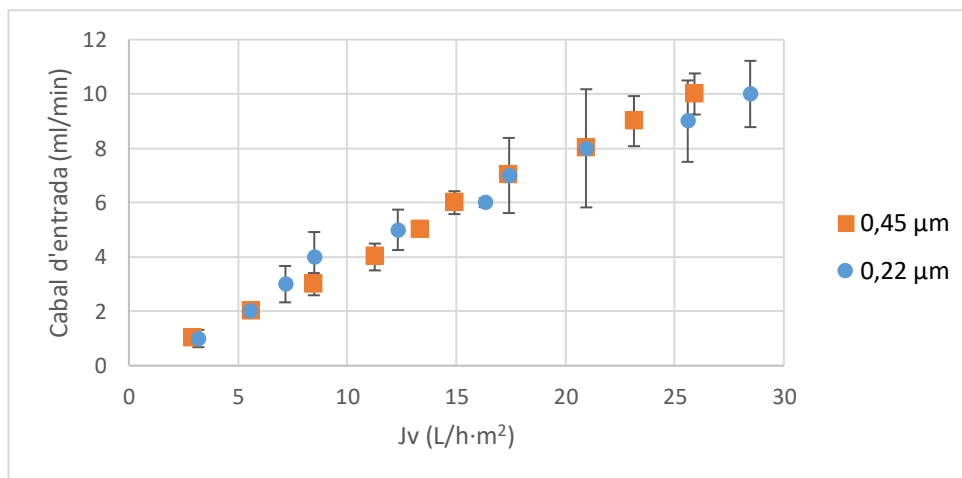


Figura 22 a) Lles flux de permeat vs cabal d'entrada (MF)

Per a l'extracte d'orujo d'oli, tal i com es mostra a la Figura 22 b) s'observa una tendència també a augmentar però al arribar al valor de 6 ml/min el flux de permeat s'estabilitza. La diferencia entre 1 ml/min i 6 ml/min en el flux de permeat és d'un 69%. Entre 6 ml/min i 10 ml/min augmenta un 6%. És per això que la tendència es a estabilitzar el valor de flux de permeat i s'estabilitza a un valor de $6 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ en $0,45 \mu\text{m}$ i a $7 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ a $0,22 \mu\text{m}$. Aquesta diferencia entre els dos extractes es deu a que les mostres d'orujo d'oli estan més concentrades i per tant els fenòmens d'embrutiment de la membrana són més grans. En conclusió en el cas de les lles es treballa a 10 ml/min ja que és el valor que dona un flux de permeat més gran i representa una millora d'un 42% respecte al flux amb 6 ml/min. En el cas de l'orujo d'oli no es treballa per sobre de 6 ml/min ja que la millora si augmenta el cabal d'entrada és un 6% comparat amb el valor de 10 ml/min.

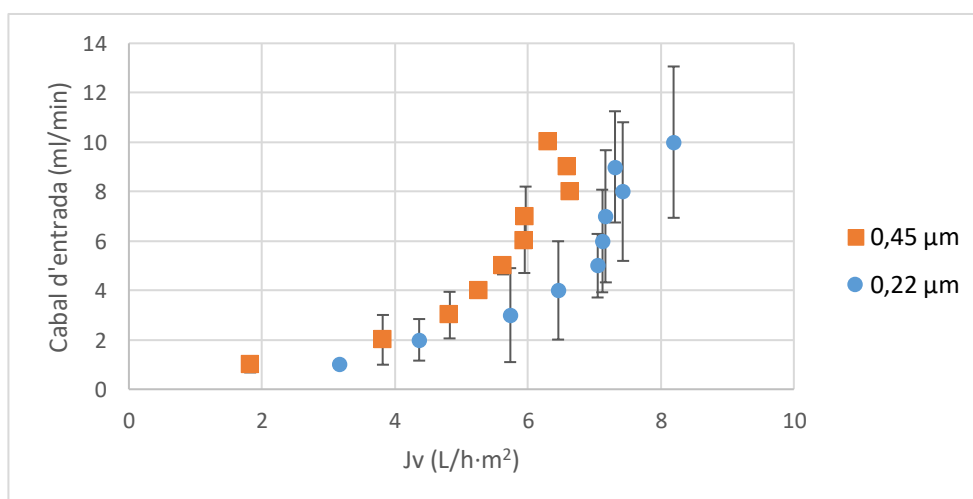


Figura 22 b) Orujo d'oli flux de permeat vs cabal d'entrada (MF)

A les figures 23 a) i b) es mostren per als dos extractes una tendència a augmentar la concentració de polifenols al permeat quan augmenta el flux d'entrada. Aquesta tendència es mostra a les dades de les lles on les concentracions a la membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ varien entre $24,7 \pm 3,3\ \text{mg/L}$ (1 ml/min) i $28,8 \pm 0,38\ \text{mg/L}$ (10 ml/min). Les dades de $0,22\ \mu\text{m}$ per als mateixos fluxos d'entrada varien entre $23,0 \pm 1,9\ \text{mg/L}$ i $28,7 \pm 0,6\ \text{mg/L}$. En el cas de l'orujo d'oli les dades de $0,45\ \mu\text{m}$ són de $146 \pm 8\ \text{mg/L}$ (1 ml/min) i $162 \pm 4,3\ \text{mg/L}$ (10 ml/min). A més la diferencia entre la concentració obtinguda entre 6 ml/min i 10 ml/min és d'un 2% i contrasta amb la obtinguda entre 1ml/min i 6ml/min que és d'un 8%. Les dades de $0,22\ \mu\text{m}$ per als mateixos fluxos d'entrada varien entre 148 mg/L i 160 mg/L.

Les concentracions de polifenols en l'alimentació són de 172 mg/L per a l'orujo d'oli i de 33 mg/L per a les lles. Per a les lles els percentatges de rebuig doncs són del 25% en fluxos d'entrada més baixos (1 ml/min) i del 15% en l'orujo d'oli per a fluxos d'entrada baixos. Per a fluxos d'entrada més alts (10 ml/min) de lles els percentatges de rebuig són del 13% i els de l'orujo d'oli són del 7%.

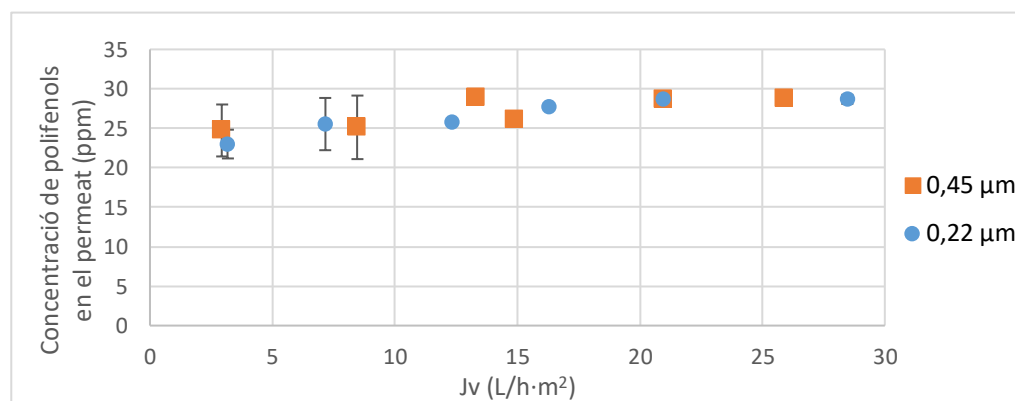


Figura 23 a) Lles Torres flux de permeat vs concentració (MF)

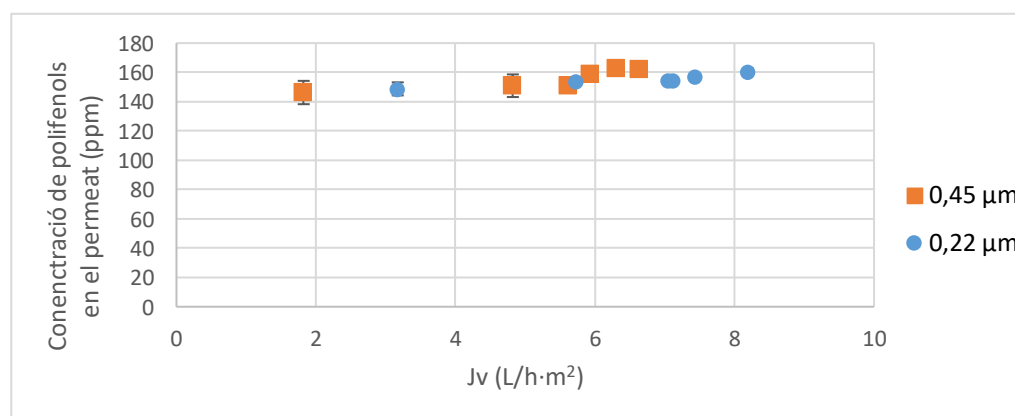


Figura 23 b) Orujo d'oli Borges flux de permeat vs concentració (MF)

Els polifenols que es troben als extractes comprenen valors entre 150 i 700 Daltons. Les membranes de microfiltració utilitzades filtren molècules més grans de 100.000 Da depenent de la membrana. S'espera que els polifenols passin a través de les membranes de microfiltració. Les concentracions de polifenols anteriorment mencionades i els percentatges de rebuig mostren que això és el que passa.

Hi ha una part dels polifenols que es rebutja degut a interaccions amb la membrana i entre ells. La conclusió és que les membranes de microfiltració rebutgen partícules presents als extractes com partícules sòlides i impureses però deixen passar els polifenols. En el cas de les lles la conclusió és treballar amb fluxos de 10 ml/min i en el cas de l'orujo d'oli treballar amb un flux de 6 ml/min.

Giacobbo et al. [40] van estudiar el comportament de les membranes de MF a l'extracte de lles. Les gràfiques de l'article comparen pressió i concentració al permeat. Es van utilitzar quatre dissolucions de lles, dues sense diluir i dues amb un factor de dilució de 10. La principal diferència és que a l'article es van estudiar els paràmetres en funció de la pressió i en aquest treball en funció del flux d'entrada. A l'article es van tractar el extracte de lles amb membranes de 0,5 μm i de 0,3 μm .

Les gràfiques de l'article mostren que les diferències entre el valor de concentració a 0,2 bars per als polifenols concentrats és de 250 i 240 mg/L i per a pressions de 1 bar de 240 i 230 mg/L, per tant disminueix. En el cas de les dissolucions menys concentrades les diferències són de 21 i 24 mg/L entre 0,2 bars i 1 bar i de 25 i 27 mg/L entre 0,2 bars i 1 bar. Aquestes dades coincideixen amb les obtingudes en aquest treball.

5.2.2. Nanofiltració (NF)

A les figures 24 a) i b) es mostra l'evolució del flux de permeat en funció del cabal d'entrada. Tal i com mostren aquestes figures la tendència és a mantenir el valor de flux de permeat constant quan augmenta el cabal d'entrada. Això vol dir que a l'augmentar el cabal d'entrada, augmenta el flux del rebuig però no el permeat. En aquest cas un major cabal d'entrada no significa un augment de la pressió a través de la membrana apreciable, ja que si augmenta la pressió, augmenta el flux de permeat.

En el cas de les lles les membranes DURACID i NF90 donen valors de flux de permeat entre $5 \pm 0,2$ i $7 \pm 0,8$ L/h·m² i les membranes TFC-HR, TFCS i NF270 donen valors entre $2 \pm 0,6$ i $4 \pm 0,4$ L/h·m². En el cas de l'orujo d'oli la NF270 dona valors entre $7 \pm 0,04$ i $7,9 \pm 0,2$ L/h·m². També per a l'orujo les membranes TFCS, TFC-HR i NF90 donen valors entre $4 \pm 0,4$, $5 \pm 0,5$, $6 \pm 0,2$ L/h·m² respectivament. La membrana DURACID dona valors de $1,4 \pm 0,1$ L/h·m². En la majoria de les membranes i als dos extractes el flux de permeat tendeix a estabilitzar-se als 3 ml/min de cabal d'entrada. No s'ha de treballar per sobre d'aquest valor ja que un augment del cabal d'entrada suposa un cost d'energia addicional que no es transforma en un augment del flux de permeat. Hi ha dues excepcions i són en el cas de les lles. Les membranes DURACID i NF270 s'estabilitzen més tard, la NF270 s'estabilitza als 5 ml/min i la

DURACID no s'estabilitza. També cal mencionar que hi ha membranes en el cas de l'orujo d'oli que s'estabilitzen abans dels 3 ml/min i són la TFCS (2 ml/min), la NF90 (2 ml/min) i la DURACID (1 ml/min).

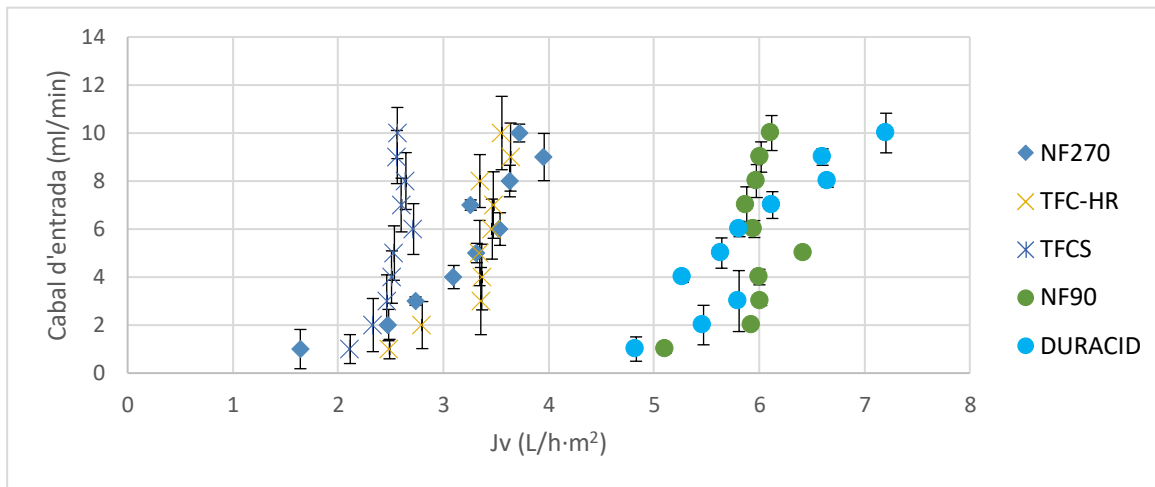


Figura 24 a) Lies Torres flux de permeat en funció del cabdal d'entrada (NF)

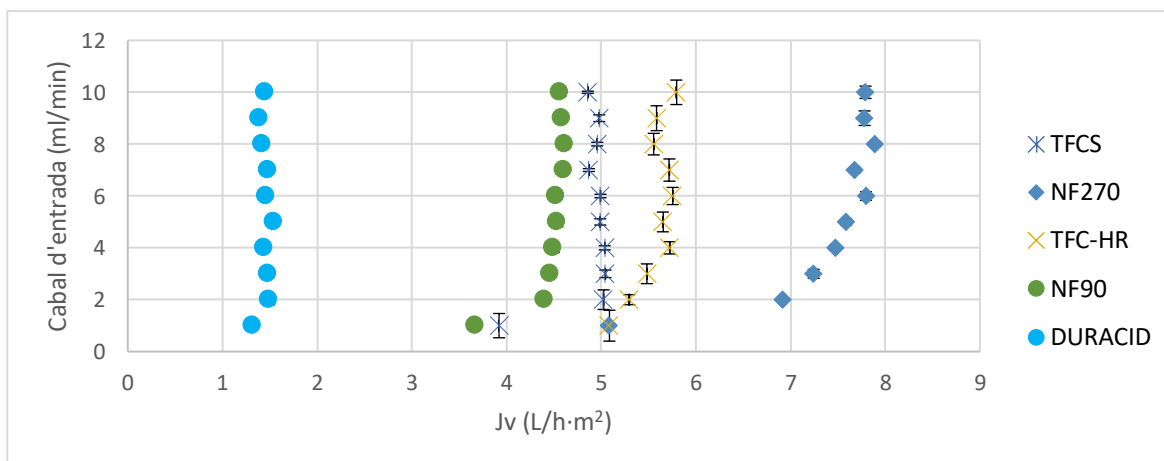


Figura 24 b) Orujo d'oli flux de permeat vs cabdal d'entrada (NF)

Les figures 25 a) i b) comparen el rebuig amb el flux de permeat. A l'eix de les x es mostra el flux de permeat i a causa de que aquest es manté constant els punts experimentals referits a una mateixa membrana estan molt junts entre ells. En el cas de les lies (Figura 25 a) les membranes TFCS i TFC-HR donen valors de concentració de polifenols molt baixos de l'ordre de 4,5 mg/L proporcionant valors de rebuig elevats, de 86,3%. També a les lies, els valors de concentració obtinguts al permeat de la membrana NF90 estan compresos entre $8 \pm 1,8$ mg/L i $6 \pm 0,8$ mg/L; això comporta valors de rebuig entre 77 i 80%. Per últim a les lies, les membranes NF270 i DURACID els valors de concentració es troben entre $17 \pm 0,3$ mg/L i $8 \pm 3,7$ mg/L. Això comporta uns valors de rebuig entre 48% i 75%.

En el cas de l'extracte de lies, per a treballar amb valors de flux elevats les membranes que s'utilitzarien serien la DURACID i la NF90. Les membranes TFC-HR i TFCS no fraccionen o separen els polifenols, sinó

que els concentren, degut als valors de rebuig per sobre del 86%. Les membranes NF270 i DURACID proporcionen valors de rebuig de polifenols al voltant del 48 i 75% per tant això vol dir que es pot separar els polifenols amb elles.

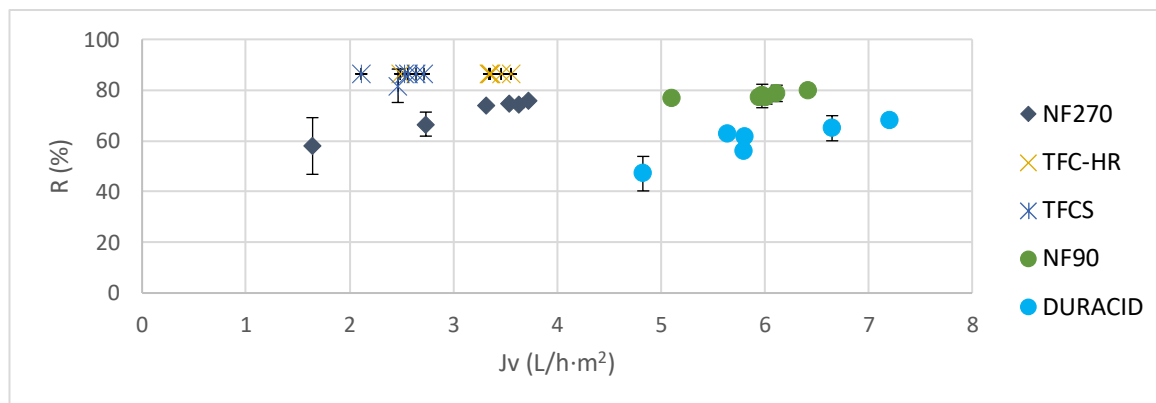


Figura 25 a) Lles Torres flux de permeat vs percentatge de rebuig (NF)

En el cas de l'orujo d'oli els valors de rebuig per la membrana TFC-HR i NF90 donen valors de percentatge de rebuig de 95,37%. Les membranes NF270 i TFCS donen valors de concentració compresos entre $25 \pm 0,75$ mg/L i 13 ± 2 mg/L; que es tradueix en percentatges de rebuig entre 85% i 90%. Per últim la membrana DURACID, obté un rang de concentracions entre $20 \pm 4,4$ mg/L i $9,8 \pm 0,3$ mg/L, que es tradueix en percentatges entre 88% i 94%.

En el cas de l'orujo d'oli, per a treballar amb valors de flux elevat s'utilitzaria la membrana NF270. En aquest cas totes les membranes donen valors superiors al 85% de rebuig per a la concentració de polifenols total, que implica que a la corrent de permeat passa un 15%. Les mostres d'orujo d'oli són més riques en polifenols en general i és per això que els percentatges de rebuig donen valors més elevats ja que aquest percentatge es calcula amb la diferència respecta la concentració inicial. Tenint això en compte les membranes amb els valors de rebuig entre 85% i 90%, que són la NF270 i la TFCS, deixen passar algun polifenol. Les membranes amb percentatges de rebuig més elevats, que són les TFC-HR, NF90 i DURACID, serveixen per a concentrar la mostra però no per fraccionar i separar els polifenols.

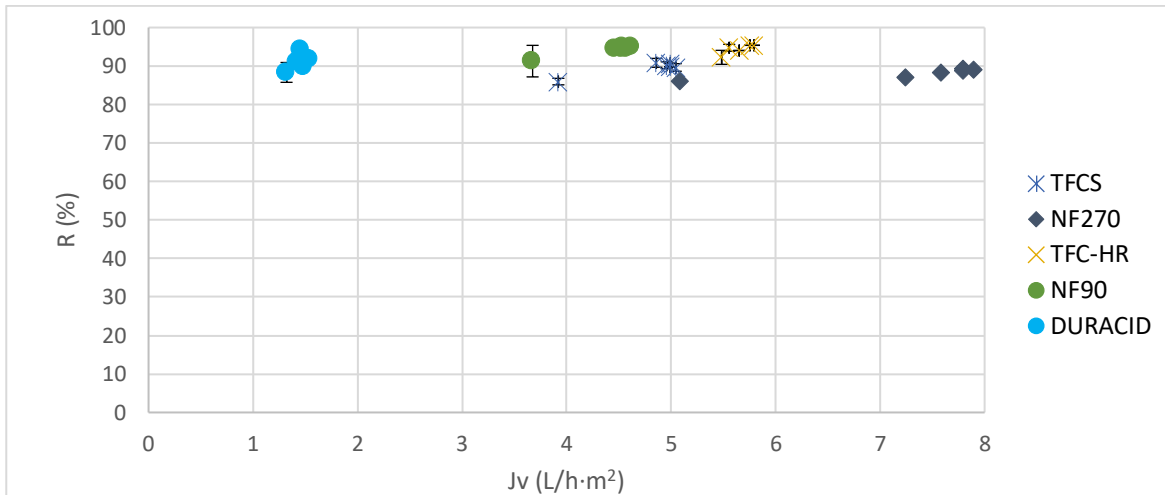


Figura 25 b) Orujo d'oli flux de permeat percentatge de rebuig (NF)

Arsuaga et al. [35] van estudiar el comportament de les membranes NF90 i TFC-HR per a separar diferents polifenols i altres compostos com àcid acètic o àcid fòrmic. A l'estudi es van utilitzar polifenols sintètics com la hidroquinona o el resorcinol. Es va fer un estudi del rebuig en funció del temps i del flux del permeat en funció del temps. Es van dur a terme dos estudis el primer amb una diferència de pressió de 5,5 bars i la membrana NF90 i el segon amb una diferència de 15,2 bars i la membrana TFC-HR. Amb la membrana NF90 per als polifenols els percentatges de rebuig van ser 50% per al resorcinol i 40% per a la hidroquinona. Aquestes dades coincideixen amb les obtingudes en aquest treball. Els valors de rebuig per a la membrana TFC-HR van ser de 90% per al resorcinol i 85% per a la hidroquinona. Aquests valors coincideixen amb els obtinguts, inclús alguns d'aquest treball són superiors.

Giacobbo et al. [41] van estudiar el comportament de tres membranes (NF270, ETNA01PP i ETNA10PP) amb les lles de vi. Les dues últimes no s'estudien en aquest treball però la primera va donar valors de rebuig dels polifenols al voltant del 90% i coincideix amb les dades obtingudes de rebuig en el cas de l'orujo d'oli ja que en aquest treball dona valors entre 85% i 90% de rebuig; tot i així per a l'extracte de lles que s'utilitza en aquest treball dona valors de rebuig entre 60% i 75% utilitzant la membrana NF270.

Cissé et al. [36] van estudiar membranes 10 membranes de NF entre les quals es troben la NF90 i la NF270. En el cas de NF els valors es van situar entre 85% i 100%. Els valors de les membranes NF270 i NF90 donen al voltant del 95% i coincideix amb l'obtingut en aquest treball per a l'orujo d'oli on els valors de rebuig són al voltant de 95% per a la NF90 i entre 85% i 90% per a la NF270. En el cas de les lles els valors no coincideixen ja que els percentatges de rebuig d'aquest treball són de 80% per a la NF90 i entre 60% i 75% per a la NF270.

5.2.3. Osmosi Inversa (OI)

Les figures 26 a) i b) mostren l'evolució del flux de permeat en funció del cabal d'entrada i les figures 27 a) i b) mostren el percentatge de rebuig de la membrana en funció del flux de permeat.

Tal i com mostren les figures 26 a) i b) la tendència és a mantenir el valor de flux de permeat constant quan augmenta el cabal d'entrada. Això vol dir que a l'augmentar el cabal d'entrada, augmenta el flux del rebuig però no el permeat. Aquest comportament coincideix amb l'obtingut a les membranes de NF.

En el cas de les lles la membrana BW30LE dona valors de flux de permeat entre $7,5 \pm 0,2$ i $10,5 \pm 1,3$ L/h·m² i s'estabilitza als 4 ml/min en 10 L/h·m². La membrana XLE dona valors entre $5,2 \pm 0,01$ i $7,5 \pm 0,4$ L/h·m² i s'estabilitza als 3 ml/min en $7,5 \pm 0,4$ L/h·m². La membrana SW30HR dona valors al voltant de $2,6 \pm 0,1$ L/h·m² i s'estabilitza des de 1 ml/min.

En el cas de l'orujó d'oli la BW30LE dona valors entre $4,9 \pm 0,3$ i $6,3 \pm 0,8$ L/h·m² i s'estabilitza als 5 ml/min. La membrana XLE dona valors entre $5,1 \pm 0,1$ i $7,3 \pm 0,3$ L/h·m² i s'estabilitza als 5 ml/min. La membrana SW30HR dona valors al voltant de $1,8 \pm 0,4$ L/h·m² i s'estabilitza des de 1 ml/min.

En totes les membranes no s'ha de treballar per sobre del valor de cabal d'entrada en el qual el flux de permeat s'estabilitza. Això és perquè suposa un ús d'energia inútil que no es trasllada a més flux de permeat.

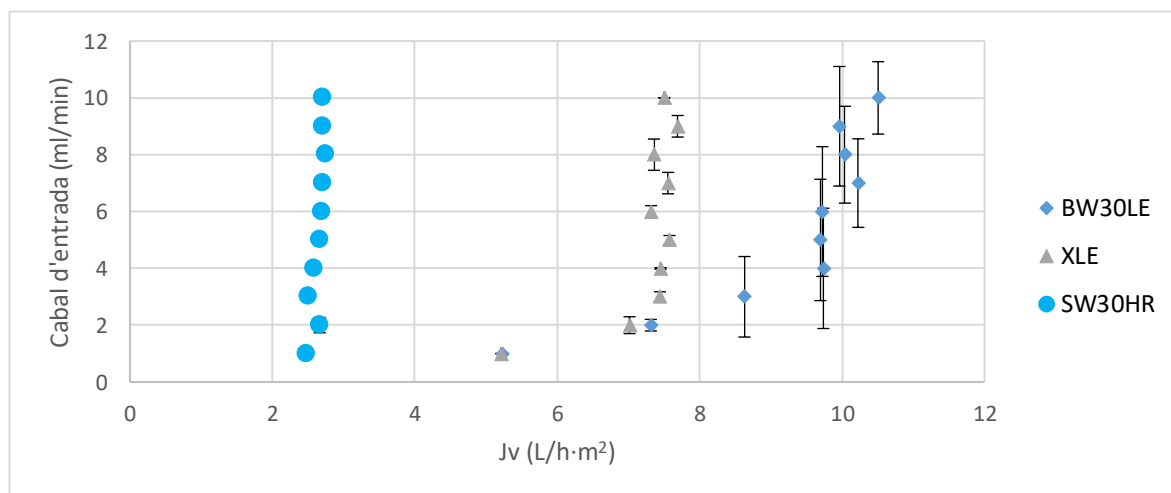


Figura 26 a) Lles Torres flux de permeat vs cabal d'entrada (OI)

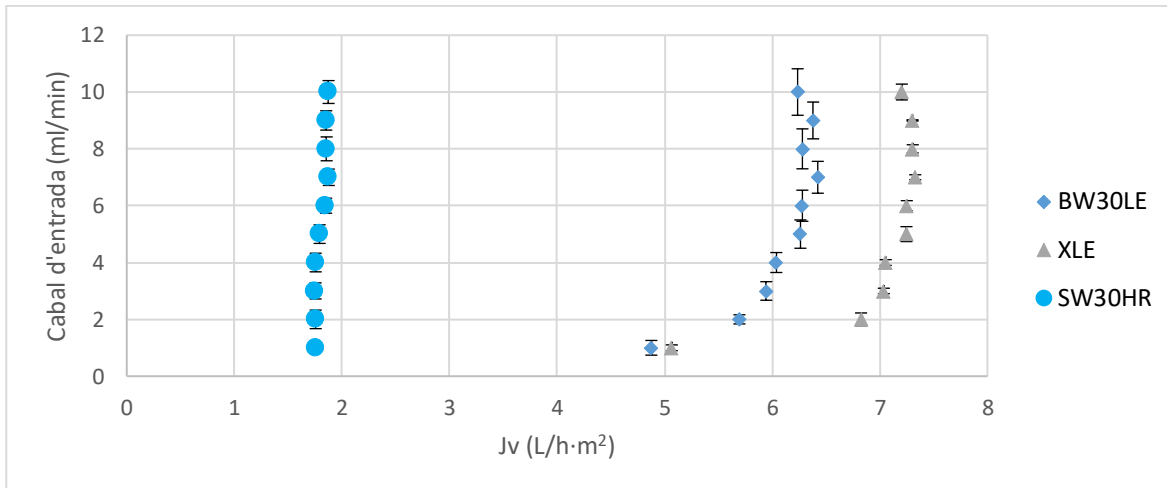


Figura 26 b) Orujo d'oli flux de permeat vs cabal d'entrada (OI)

Les figures 27 a) i b) comparen el percentatge de rebuig amb el flux de permeat. En el cas de les lies, les membranes BW30LE, SW30HR i XLE donen valors de rebuig més elevats de 86,3%, no es pot calcular el valor amb precisió.

En el cas de l'extracte de lies, per a treballar amb valors de flux elevats la membrana que s'utilitzaria és la BW30LE. Les tres membranes són membranes que serveixen per concentrar els polifenols de l'extracte de lies, però no per separar-los ni fraccionar-los degut a l'elevat valor del percentatge de rebuig.

En el cas de l'orujo d'oli les tres membranes donen valors de concentració de polifenols compresos entre $9 \pm 0,1$ mg/L i $15 \pm 2,2$ mg/L; i això es tradueix en valors de rebuig d'entre el 91% i el 95,4%.

En el cas de l'orujo d'oli, per a treballar amb valors de flux elevat s'utilitzaria la membrana XLE. En aquest cas totes les membranes donen valors superiors al 90% de rebuig per a la concentració de polifenols total. Per tant, aquestes membranes tenen la capacitat de concentrar l'extracte en polifenols, però no tenen la capacitat de fraccionar-los o separar-los degut als elevats valors de rebuig, tal i com passa a l'extracte de lies.

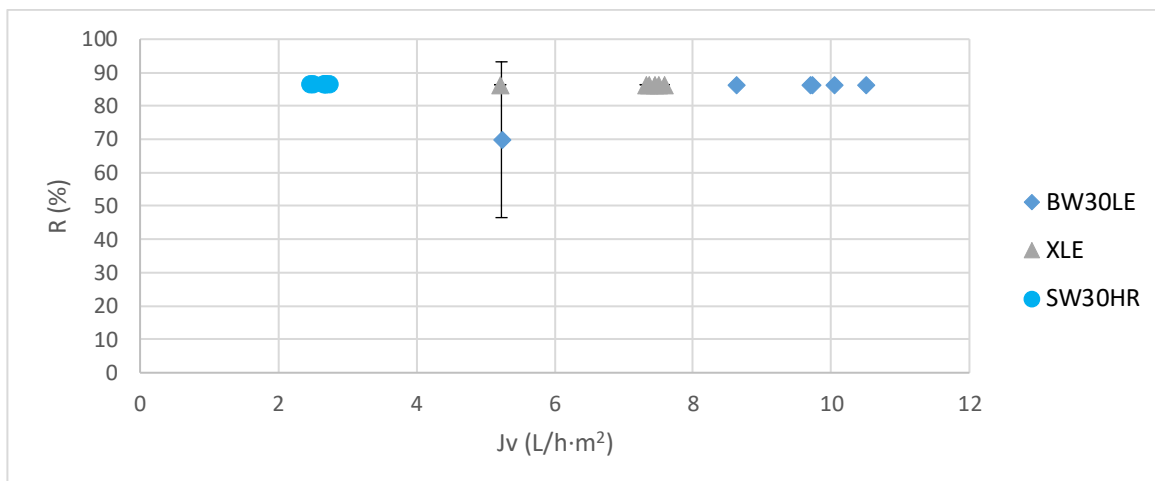


Figura 27 a) Lles Torres flux de permeat vs percentatge de rebuig (OI)

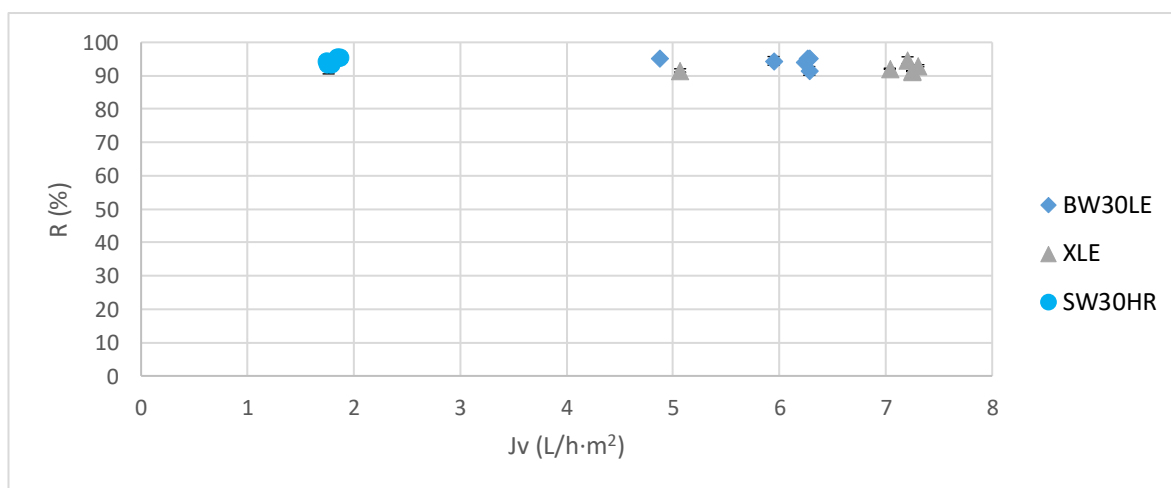


Figura 27 b) Orujo d'oli flux de permeat vs concentració (OI)

Arsuaga et al. [34] van estudiar el comportament de tres membranes NF90, TC-HR i BW30 i la influència dels grups funcionals dels polifenols en el seu tractament. Els resultats que es van obtenir per a la NF90 en funció del flux són del 20% de rebuig a fluxos relatius respecte l'aigua del 0,7. A fluxos relatius de gairebé 1 la mateixa membrana es van obtenir percentatges de rebuig de 70%. Les membranes TFC-HR i BW30 van obtenir percentatges de rebuig del 70% a fluxos relatius de 0,7 i percentatges de 90% a fluxos relatius de gairebé 1. Aquestes últimes dades de les membranes de OI coincideixen amb les obtingudes per la membrana BW30 en els dos extractes en aquest treball. En aquest treball per a les lles s'obté un percentatge superior a 86% i per a l'oli entre 90% i 95% i coincideix.

6. Anàlisi de l'impacte ambiental

Aquest TFG ha estudiat la possibilitat de valoritzar residus agroalimentaris que fins al moment només s'utilitzaven per aconseguir energia o compostatge. Per tant el treball en si té un contingut essencialment mediambiental, de sostenibilitat industrial i de circularitat a la indústria agroalimentària.

La anàlisi de sostenibilitat i de circularitat del procés a desenvolupar estava fora del abast del estudi ja que només ha suposat una pre-avaluació d'una potencial ruta de tractament i valorització, i no estava dedicat a proposar un esquema global de tractament.

Per tant l'impacte ambiental del TFG s'ha centrat al treball experimental desenvolupat a escala de laboratori.

Tant a l'etapa d'extracció com a l'etapa de separació de polifenols es generen residus relacionats amb els experiments del laboratori. Els filtres d'un sol ús, guants, xeringues, puntes de pipetes i membranes són residus sòlids que es dipositen al contenidor de sòlids absorbents contaminats.

Es generen residus líquids a l'hora de descartar els extractes utilitzats en els experiments amb membranes. Tota la resta de líquids són mostres i es guarden en fred (4°C) degudament etiquetats fins al seu posterior anàlisi. Per a l'estudi del pH es genera aigua residual que s'aboca al contenidor corresponent del laboratori.

L'impacte ambiental dels residus generats per les indústries de l'oli i del vi és molt gran i aquest projecte n'estudia la minimització. Moldes et al. [42] estudien els efectes negatius de l'abocament de lies de vi al sòl. A l'estudi s'analitzen i es duen a terme tests per avaluar el contingut de nutrients i els efectes d'aquests residus en plantes i el terra. Els resultats mostren que moltes llavors tractades amb els residus no germinaven i això demostra l'impacte negatiu d'aquests residus.

En el cas de l'oli, Rusan et al. [43] van estudiar la toxicitat dels residus de l'oli i l'efecte en la germinació de blat. Els resultats mostren que els residus són molt tòxics i inhibeixen la germinació de les llavors, tot i que la germinació si que succeeix quan els residus són tractats fins a un 25% ja que s'eliminen bona part dels polifenols i altres components tòxics.

7. Conclusions

El treball experimental desenvolupat en la avaluació de processos de recuperació de polifenols de mostres de la indústria vitivinícola i oleica es poden resumir en els següents punts:

Les millors condicions d'extracció amb la tècnica de extracció sòlid/líquid fent servir aigua com a dissolvent ("maceració") per a les lles són de 10 minuts d'extracció amb una relació sòlid:líquid de 1:100 (g:ml) a 70°C i sense alterar les condicions de pH fent únicament una extracció.

Per a les mostres d'orujo d'oli les millors condicions d'extracció són 10 minuts d'extracció amb una relació sòlid:líquid de 1:30 (g:ml) a 25°C i sense alterar les condicions de pH també només fent una extracció.

Quan es va comparar els rendiments d'extracció fent servir tècniques avançades com ultrasons o extracció amb dissolvents orgànics amb l'extracció fent servir aigua i temperatures de 70°C, els resultats amb aquesta última van ser iguals o millors i per tant des d'un punt de vista de consum energètic es recomana la tècnica d'extracció sòlid-líquid tradicional.

La possibilitat d'utilitzar aigua com a dissolvent en comparació a dissolvents orgànics com l'etanol, suposa un gran guany econòmic i també suposa una simplificació de la operació de membranes i de processos de filtració.

La separació de polifenols amb les membranes de MF mostra que per a les lles es treballa a 10 ml/min de cabal d'entrada i per a l'orujo d'oli a 6 ml/min.

Els percentatges de rebuig varien al voltant del 20% per ambdós extractes i no separen o fraccionen els polifenols, retenen partícules sòlides i impureses.

En el cas de la NF, les membranes on es separen més polifenols són la NF270 (45%) en base a una capa activa de poliamida semi aromàtica i la DURACID (75%) en base a una capa activa de polisulfamida per a les lles i la TFCS (90%) i la NF270 (85%) per a l'orujo d'oli. Mentre que les membranes NF90, TFC-HR i TFCS, en base a una capa activa de poliamida aromàtica, a les lles donen percentatges de rebuig del 86% i les membranes TFC-HR, DURACID i NF90 donen percentatges de rebuig del 95%. Al ser tan elevats no fraccionen els polifenols sinó que els concentren.

En el cas de les membranes de OI, en base a una capa activa de poliamida aromàtica els percentatges de rebuig també són del 86% per a les lles i 95% per a l'orujo d'oli i són membranes que serveixen per concentrar els polifenols i no per separar-los.

8. Anàlisi Econòmica

8.1. Cost dels experiments

En aquest apartat es mostra un breu anàlisi econòmic dels experiments fets al laboratori. En primer lloc, a la taula 12 es mostra el cost dels equips de laboratori en funció del cost inicial de l'equip, la vida útil i el temps que s'han utilitzat:

Taula 12 Cost de l'equip de laboratori [48][49][50]

Equip	Cost inicial (€)	Temps d'ús (anys)	Vida útil (anys)	Cost final (€)
Ultrasons	815	0.08	10	6,8
HPLC	49.600	0.25	10	1.240
Balança analítica	376	0.25	10	9,4
Placa agitadora i calefactora	695	0.25	10	17,4
Bomba d'alta pressió	3500	0.125	10	87,5
Equip de membranes	3465	0.125	5	86,6
Centrífuga	4389	0.25	10	109,7

A la taula 13 s'exposa el cost dels reactius que es fan servir per als experiments:

Taula 13 Cost dels reactius [48][49][50]

Reactiu	Quantitat	Preu (€/l)	Cost final (€)
Etanol	0,2 l	39,1	7,0
Aigua MilliQ	8,3 l	1,0	8,3
Acetonitril	1 l	25,50	25,5
HCl	0,04 l	10	0,4

NaOH	20,4 g	6,0 (€/kg)	0,12
------	--------	------------	------

A la taula 14 s'exposa el cost del material de laboratori:

Taula 14 Cost del material de laboratori [48][49][50]

Material	Unitats utilitzades (u)	Preu (€/u)	Cost (€)
Tubs falcon 50 mL	154	0,34	52,36
Filtre xeringa 0,45 µm	154	1.54	237,16
Pipeta de vidre 15 mL	1	7,73	7,73
Pipeta de vidre 10 mL	1	7,50	7,50
Pipeta de vidre 50 mL	1	15,99	15,99
Micropipeta 1-10 mL	1	39.98	39,98
Vas de precipitats 25 mL	3	15,00	45,00
Vas de precipitats 50 mL	3	19,00	60,00
Vas de precipitats 150 mL	3	19,50	63,00
Vas de precipitats 2500 mL	3	19,50	63,00
Vial 2 mL	500	0,0998	49,90
Tub eppendorf	720	0,06	43,20
Puntes de pipeta	400	0,05	20,00
Probeta 10 mL	1	7,97	7,97
Vidre de rellotge	3	7,75	23,25
Imán de laboratori	3	2,75	8,25
Xeringues	50	1,5	75

A la taula 15 s'exposa el cost de les membranes:

Taula 15 Cost de les membranes

Membrana	Fabricant	Unitats (u)	Preu per unitat (€/u)	Cost final (€)
MF				
Filtres en format disc 0,45µm	Filtros Anioia	4	0,94	3,76
Filtres en format disc 0,22µm	Filtros Anioia	4	0,94	3,76
NF				
DURACID	GE	4	26,3	105,08
TFCS	KMS-Fluid Systems	4	30	120,00
TFC-HR	KMS-Fluid Systems	4	30	120,00
NF270	Dow-Filmtec	4	20,7	82,43
NF90	Dow-Filmtec	4	26,3	105,16
OI				
BW30LE	Dow-Filmtec	4	26,3	105,08
SW30HR	Dow-Filmtec	4	26,3	105,08
XLE	Dow-Filmtec	4	23,3	93,36

Als experiments de maceració s'escalfa la mostra fins a diferents temperatures i això té un cost d'energia associat. A continuació es mostren els costos d'escalfar 20 ml d'aigua MilliQ des de 25°C fins a 50°C, 70°C i 90°C. Aquests càlculs es fan utilitzant la fórmula de $Q = m \cdot C_p \cdot \Delta T$ i es converteixen els ml d'aigua en massa utilitzant la densitat de l'aigua (1 kg/L). Un cop obtinguda la calor necessària amb aquesta fórmula es converteix a kW/h i tot seguit amb el preu de l'energia a €. Per a extreure les conclusions sobre les millors condicions de temperatura s'utilitzen aquestes dades.

- 50°C / 0,000094€

- 70°C / 0,000169€
- 90°C / 0,000245€

Aquests valors corresponen a l'aigua MilliQ del laboratori i són molt baixos, estan lluny d'un cèntim. Aquest càlcul pren rellevància quan el volum de residus a tractar és de tones i aquests valors es multipliquen per un milió.

8.2. Cost personal

En aquest apartat es calcula el cost de personal necessari per a dur a terme els experiments i el treball en el seu conjunt. Aquests càlculs es divideixen en el treball de l'autor del projecte i en el treball del director del projecte. Es mostren els resultats a les taules 16 i 17.

Taula 16 Cost personal de l'autor del projecte

Autor	Temps invertit (h)	Sou (€/h)	Cost (€)
Cerca i lectura bibliogràfica	50	11,00	550
Experimentació al laboratori	300	11,00	3300
Resultats	70	11,00	770
Redacció de la memòria	70	11,00	770

Taula 17 Cost personal del director del projecte

Director	Temps invertit (h)	Sou (€/h)	Cost (€)
Direcció del projecte	80	20	1600

8.3. Cost total

A la taula 18 es mostra el cost total del projecte tenint en compte el cost experimental i personal:

Taula 18 Cost total del projecte

	Tipus	Cost (€)
Cost experimental	Equips	1550,64
	Reactius	40,84
	Material	691,93
	Membranes	843,71
Cost personal	Total	6990,00
Cost total del projecte		10117,12

9. Bibliografia

- [1] A. Gelman and M. De Rosnay, "Durham Research Online Symbolic Play," *FiveThirtyEight*, vol. 44, no. June, pp. 0–44, 2019.
- [2] E. Lewis and E. Lewis, "Circular Economy," *Sustainaspeak*, pp. 58–59, 2018.
- [3] C. Beres *et al.*, "Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review," *Waste Manag.*, vol. 68, pp. 581–594, 2017.
- [4] D. Cartalade and A. Vernhet, "Polar interactions in flavan-3-ol adsorption on solid surfaces," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 8, pp. 3086–3094, 2006.
- [5] A. Teixeira *et al.*, "Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 9, pp. 15638–15678, 2014.
- [6] S. Dermeche, M. Nadour, C. Larroche, F. Mouliti-Mati, and P. Michaud, "Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies," *Process Biochem.*, vol. 48, no. 10, pp. 1532–1552, 2013.
- [7] International Olive Oil Council, "Huiles D ' Olive - Olive Oils," *Int. Olive Oil Counc.*, no. June, p. 2018, 2018.
- [8] A. Cassano, G. De Luca, C. Conidi, and E. Drioli, "Effect of polyphenols-membrane interactions on the performance of membrane-based processes. A review," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 351, pp. 45–75, 2017.
- [9] L. Bazinet and A. Doyen, "Antioxidants, mechanisms, and recovery by membrane processes," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 4, pp. 677–700, 2017.
- [10] T. W. Caldas *et al.*, "Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods," *Ind. Crops Prod.*, vol. 111, no. October 2017, pp. 86–91, 2018.
- [11] C. Drosou, K. Kyriakopoulou, A. Bimpilas, D. Tsimogiannis, and M. Krokida, "A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts," *Ind. Crops Prod.*, vol. 75, pp. 141–149, 2015.
- [12] A. Antonioli, A. R. Fontana, P. Piccoli, and R. Bottini, "Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec," *Food Chem.*, vol. 178, pp. 172–178, 2015.
- [13] I. L. Jurcevic, M. Dora, I. Guberovic, M. Petras, S. R. Brncic, and D. Dikic, "Polyphenols from wine lees as a novel functional bioactive compound in the protection against oxidative stress and hyperlipidaemia," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 55, no. 1, pp. 109–116, 2017.
- [14] A. F. Processing and Q. Management, "Preferences for Groundnut Products among Urban Residents in Ghana 1 Running title: Preferences for Groundnut Products Ting Meng."

- [15] B. Díaz-Reinoso, A. Moure, J. González, and H. Domínguez, "A membrane process for the recovery of a concentrated phenolic product from white vinasses," *Chem. Eng. J.*, vol. 327, pp. 210–217, 2017.
- [16] R. Elkacmi, N. Kamil, and M. Bennajah, "Separation and purification of high purity products from three different olive mill wastewater samples," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 1, pp. 829–837, 2017.
- [17] I. D'Antuono *et al.*, "Polyphenolic characterization of olive mill wastewaters, coming from Italian and Greek olive cultivars, after membrane technology," *Food Res. Int.*, vol. 65, no. PC, pp. 301–310, 2014.
- [18] L. Ioannou-Ttofa *et al.*, "Treatment efficiency and economic feasibility of biological oxidation, membrane filtration and separation processes, and advanced oxidation for the purification and valorization of olive mill wastewater," *Water Res.*, vol. 114, pp. 1–13, 2017.
- [19] M. de los Á. Fernández, M. Espino, F. J. V. Gomez, and M. F. Silva, "Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products," *Food Chem.*, vol. 239, pp. 671–678, 2018.
- [20] M. H. Alu'datt, I. Alli, K. Ereifej, M. Alhamad, A. R. Al-Tawaha, and T. Rababah, "Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake," *Food Chem.*, vol. 123, no. 1, pp. 117–122, 2010.
- [21] B. Aliakbarian, A. A. Casazza, and P. Perego, "Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor," *Food Chem.*, vol. 128, no. 3, pp. 704–710, 2011.
- [22] I. Aissa, N. Kharrat, F. Aloui, M. Sellami, M. Bouaziz, and Y. Gargouri, "Valorization of antioxidants extracted from olive mill wastewater," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 64, no. 4, pp. 579–589, 2017.
- [23] Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, "Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review," *Chinese Med. (United Kingdom)*, vol. 13, no. 1, pp. 1–26, 2018.
- [24] Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, "Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review," *Chinese Med. (United Kingdom)*, vol. 13, no. 1, pp. 1–26, 2018.
- [25] C. W. Huie, "A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 23–30, 2002.
- [26] M. Romdhane and C. Gourdon, "Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound," *Chem. Eng. J.*, vol. 87, no. 1, pp. 11–19, 2002.
- [27] T. Xia, S. Shi, and X. Wan, "Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion," *J. Food Eng.*, vol. 74, no. 4, pp. 557–560, 2006.
- [28] M. A. Rostagno, M. Palma, and C. G. Barroso, "Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones," *J. Chromatogr. A*, vol. 1012, no. 2, pp. 119–128, 2003.
- [29] N. Čujić, K. Šavikin, T. Janković, D. Pljevljakušić, G. Zdunić, and S. Ibrić, "Optimization of

- polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique," *Food Chem.*, vol. 194, pp. 135–142, 2016.
- [30] B. R. Albuquerque *et al.*, "Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques," *Ind. Crops Prod.*, vol. 95, pp. 404–415, 2017.
- [31] A. A. Jovanović *et al.*, "Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 179, pp. 369–380, 2017.
- [32] M. Ulbricht, W. Ansorge, I. Danielzik, M. König, and O. Schuster, "Fouling in microfiltration of wine: The influence of the membrane polymer on adsorption of polyphenols and polysaccharides," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 68, no. 3, pp. 335–342, 2009.
- [33] H. Nawaz, J. Shi, G. S. Mittal, and Y. Kakuda, "Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 48, no. 2, pp. 176–181, 2006.
- [34] J. M. Arsuaga, A. Sotto, M. J. López-Muñoz, and L. Braeken, "Influence of type and position of functional groups of phenolic compounds on NF/RO performance," *J. Memb. Sci.*, vol. 372, no. 1–2, pp. 380–386, 2011.
- [35] M. J. López-Muñoz, J. M. Arsuaga, and A. Sotto, "Separation of phenols and their advanced oxidation intermediate products in aqueous solution by NF/RO membranes," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 71, no. 2, pp. 246–251, 2010.
- [36] M. Cissé, F. Vaillant, D. Pallet, and M. Dornier, "Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.)," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 9, pp. 2607–2614, 2011.
- [37] C. Conidi, A. Cassano, and E. Drioli, "Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration," *Food Bioprod. Process.*, vol. 90, no. 4, pp. 867–874, 2012.
- [38] B. R. Albuquerque *et al.*, "Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques," *Ind. Crops Prod.*, vol. 95, pp. 404–415, 2017.
- [39] J. M. Cruz, J. M. Domínguez, H. Domínguez, and J. C. Parajó, "Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: A procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity," *Food Chem.*, vol. 67, no. 2, pp. 147–153, 1999.
- [40] A. Giacobbo, J. M. Do Prado, A. Meneguzzi, A. M. Bernardes, and M. N. De Pinho, "Microfiltration for the recovery of polyphenols from winery effluents," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 143, pp. 12–18, 2015.
- [41] A. Giacobbo, A. M. Bernardes, and M. N. de Pinho, "Sequential pressure-driven membrane operations to recover and fractionate polyphenols and polysaccharides from second racking wine lees," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 173, pp. 49–54, 2017.

- [42] A. B. Moldes, M. Vázquez, J. M. Domínguez, F. Díaz-Fierros, and M. T. Barral, "Negative effect of discharging vinification lees on soils," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 13, pp. 5991–5996, 2008.
- [43] M. J. M. Rusan, A. A. Albalasmeh, S. Zuraiqi, and M. Bashabsheh, "Evaluation of phytotoxicity effect of olive mill wastewater treated by different technologies on seed germination of barley (*Hordeum vulgare* L.)," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 22, no. 12, pp. 9127–9135, 2015.
- [48] "ITW Reagents." [Online]. Available: [Accessed: 22-May-2019]. Memoria 56
- [49] "Sigma-Aldrich." [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>. [Accessed: 22- May-2019].
- [50] "Fisher Scientific: Lab Equipment and Supplies." [Online]. Available: <https://www.fishersci.es/es/es/home.html>. [Accessed: 22-May-201

